

# TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

男性更年期障害改善に有用な新規食品素材の探索

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2015-06-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 石井, 美深 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1067">https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1067</a>

**修士学位論文**  
**男性更年期障害改善に有用な**  
**新規食品素材の探索**



**平成 21 年度**  
**( 2010 年 3 月 )**  
**東京海洋大学大学院**  
**海洋科学技術研究科**  
**食機能保全科学専攻**

**石井 美深**

## 第1章 序論

### 1 - 1 男性更年期障害

男性の更年期障害は、女性の閉経のように時期がはっきりとしたホルモンの分泌機能の低下がないので、加齢によるテストステロンの低下は穏やかであるが、多くの男性が前立腺肥大症、男性型脱毛症、ED、無気力などの症状に悩まされている [ 1 ]。生命に直接関わる症状ではないが QOL ( Quality of Life ) の低下を引き起こしているのは明らかである。

男性更年期障害は「加齢に伴う臨床的・生化学的症候群であり、特有の症状と血中テストステロン低下に特徴づけられる」と定義されており、2004年にブラハで開催された国際学会で LOH ( late-onset hypogonadism ) 症候群と呼ばれるようになった [ 2 ]。

### 1 - 2 男性更年期障害とテストステロン

生体内の代表的な男性ホルモンのテストステロンは、血中において 98% が結合型、2% が遊離型 ( フリーテストステロン ) として存在している ( 図 1 )。結合型には、アルブミン結合型テストステロンと性ホルモン結合グロブリン ( SHBG : sex hormone binding globulin ) 結合型テストステロンの 2 種類が知られている。男性ホルモンとして活性があるのはフリーテストステロンとアルブミン結合型テストステロンであり、これらはバイオアベイラブルテストステロンと呼ばれている。SHBG 結合型テストステロンは解離しにくいいため活性を示さない。加齢に伴い SHBG が増加して、フリーテストステロンの減少が生じる [ 3 ]。ため、加齢によるフリーテストステロン低下は多く報告されているが、総テストステロンの加齢による減少の報告は少ない。現在、総テストステロンよりもフリーテストステロンで評価を行うべきだと考えられている [ 4 ]。

テストステロンは男性の性徴を維持するだけでなく、筋肉、骨、脳などの組織機能を維持する重要な働きがあり、性腺機能不全患者にテストステロン補充療法で骨量、筋力、性欲の改善は確認されている [ 5 ]。また加齢とともに精巣機能が低下して、その結果、血中テストステロンが低下すると、性腺機能不全と同様な症状が伴う場合もあることもわかっている [ 6 ]。男性更年期障害の臨床症状としては、精神・心理症状、身体症状、性機能関連症状の 3 つに分けることができる [ 7 ]。また、図 2 に示すように、男性更年期障害の原因は大きく 2 つに分けることができる。1 つは加齢に伴う血中テストステロン低下が引き起こす性機能全般の低下や筋力・骨量低下であり、これらにはアンドロゲン療法が有効である。もう 1 つはテストステロンが細胞内でジヒドロテストステロンに関連する男性脱毛症や前立腺が肥大することによる排尿障害であり、これらはアンドロゲン作用に起因するものなので抗アンドロゲン療法が有効である。このように療法としては相対するものであるが、どちらともテストステロンに関連しているという点は共通している。

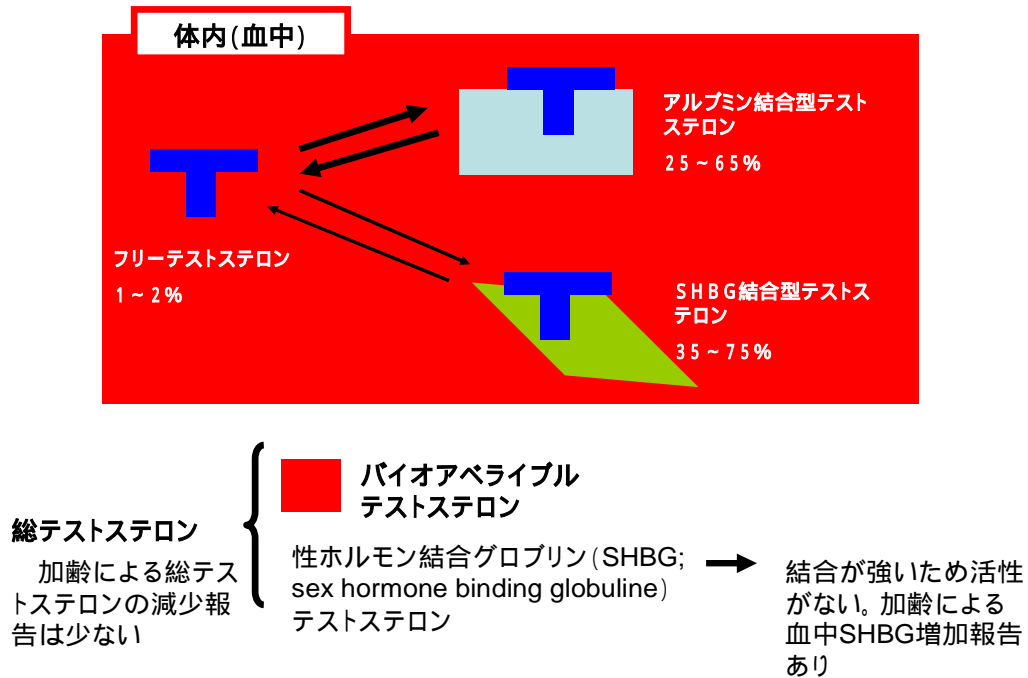


図 1 血中テストステロンについて

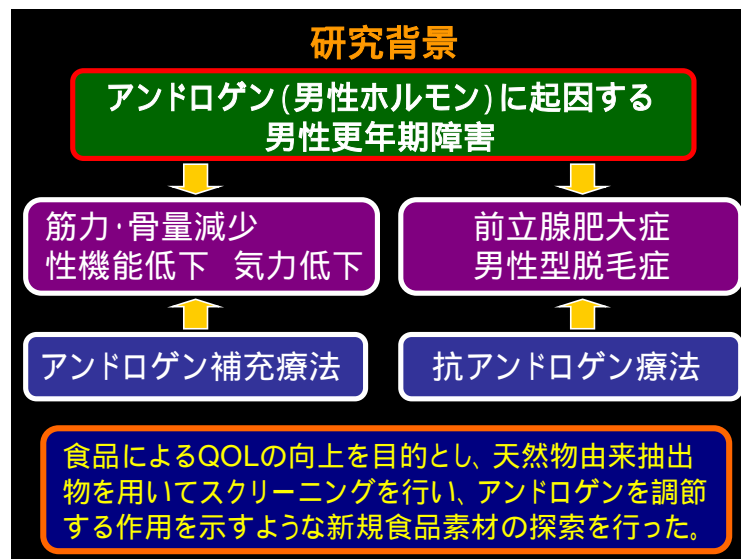


図 2 男性更年期障害の種類

### 1 - 3 テストステロンとジヒドロテストステロン

テストステロンの多くは精巣のライデッヒ細胞のミトコンドリアで生合成されたプレグネノロンからの酵素系でアンドロステジオンなどを介して合成されており、細胞内での小胞体の占める割合と直線関係である。ヒトの血漿中のテストステロンは男性で  $0.74 \pm 0.25 \mu\text{g/dl}$ 、女性で  $0.07 \pm 0.03 \mu\text{g/dl}$  であり明らかに性差がある。テストステロンを含む精巣からのステロイドホルモンは不明なものが多いが、ヒトやラット試験で、精嚢腺や前立腺などの標的臓器では  $5\alpha$  ジヒドロテストステロン ( $5\alpha$ -dihydrotestosterone; DHT) が関与していることは確認されており、テストステロンが細胞内の還元酵素である  $5\alpha$  リダクターゼにより変換されて、DHT が作られる。DHT はテストステロンの約 5 倍以上の強い男性ホルモン活性をもっており、哺乳類で雄性副性器内のレセプターと結合する [ 図 3 ]

$5\alpha$  リダクターゼは 1 型と 2 型があり、2 型と比較して 1 型は活性が強いことが知られている [ 8 ]。アンドロゲン関連の動物試験において、雄の去勢ラットの精嚢腺・前立腺を指標とするのが一般的に行われている [ 9, 10 ]

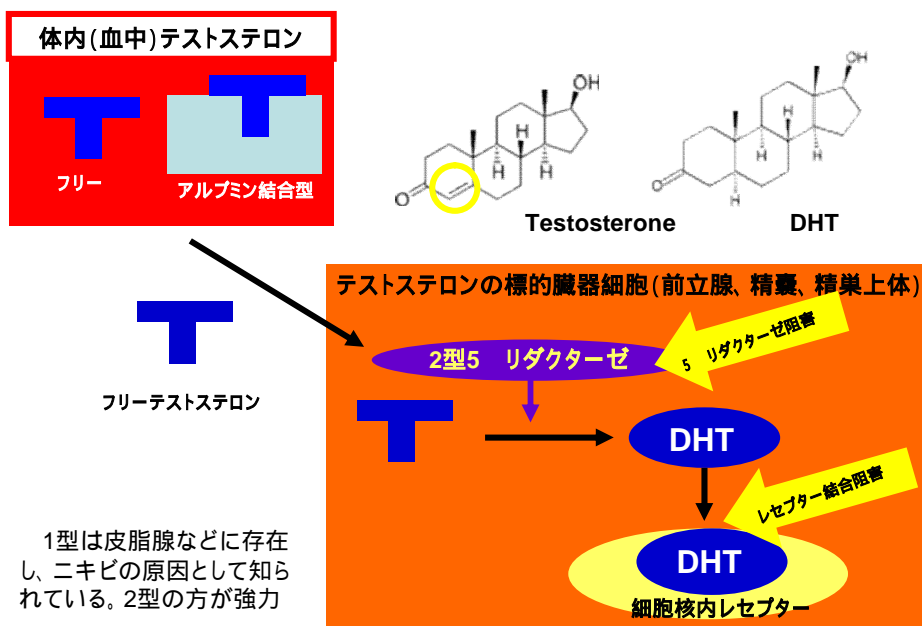


図 3 テストステロンと DHT の作用

#### 1 - 4 現在使用されている薬物療法

先述したように、男性更年期障害の薬物治療は、症状に合わせてアンドロゲン補充療法か抗アンドロゲン療法を選択して行う必要がある。

抗アンドロゲン療法は、前立腺肥大や脱毛症などの症状に合わせて Finasteride や Flutamide などの抗アンドロゲン剤などが使用される。Finasteride は 5 $\alpha$  リダクターゼ阻害剤であり、Flutamide は受容体結合阻害剤である。これらの医薬品は有用ではあるが、問題点もある。例えば、前立腺肥大患者が Finasteride を摂取した場合、極度の肥大患者には効果がわかるが、ほとんどの場合は、少なくとも半年から 1 年は服用する必要があり、副作用としては 10%の患者にインポテンツ、性欲減退および乳房の腫れが見られた。また前立腺特異抗原 (PSA) の値も低下させる。PSA は前立腺ガンの検査で使われるマーカーであり、PSA の上昇は約 70%の確立で前立腺ガンの存在を示すが Finasteride の服用中は前立腺ガンに冒された細胞が形成する PSA も阻害するので、前立腺ガンの早期発見を妨げるケースも発生している [ 11, 12 ]

アンドロゲン補充療法は、Hormone replacement therapy (HRT) と言われており、主に筋肉注射による使用がよく用いられている。注射するのはエナント酸テストステロンという医薬品で、使用量や使用間隔は個人によって異なるので医師との相談が必須である。副作用は前立腺ガン、前立腺肥大症、多血症、肝機能障害や脂質代謝異常、睡眠時無呼吸などが報告されている。加えて、筋肉注射は痛みも伴うなどのデメリットがある。また、テストステロン低下による性機能の改善を目的としたものでは、1999 年より日本でモクエン酸シルデナフィル (バイアグラ) の使用が可能になったが、経口薬であり有効性が非常に高いことより治療に用いられている反面で、副作用もあり、コストも高いので患者の負担は大きい。合成ステロイド剤はテストステロンなどのアンドロゲンの一部の分子構造を作用がより長く持続して、吸収がより高く、作用が強くなるような構造に変えているものであり、体内ではアンドロゲンの構造と付加された構造を切り離してアンドロゲンを代謝するため、付加された分子部分は異物と判断されて、多くは肝臓で処理されるので負担が大きく肝臓病の発症が報告されている。

男性ホルモンに関わる有用な医薬品も存在するが、男性ホルモン値が急激に上下変化する動きは、通常の生理的リズムとは大きく異なるためヒトの身体にとって良いとは言えない。

## 1 - 5 機能性食品素材について

毎日の規則正しい食生活に加えて、予防医学的に一般食品にとり入れられるべきものがヘルスフードである [ 13 ]。現在、男性の更年期障害の予防・改善に有用なヘルスフードとして、漢方各種、ノコギリヤシ、マツの花粉や各種ハーブなどが流通している。

漢方は作用が穏やかで、身体全体に負担をかけることなく働き、副作用も少ないことから人気のある治療薬として使われている。泌尿器科では「実虚問診表」という質問紙（富山医科薬科大学泌尿器科の風間泰蔵ら作成）を使用して患者の体質を判定して漢方薬を処方しているところもある [ 5 ]。男性更年期によく使用する漢方として、頭痛・めまい・耳鳴り・動機には当帰芍薬散（トウキシャクヤクサン）、不眠・冷え・のぼせあがり、精神症状には加味ショウ遥散（カミショウヨウサン）、頭痛・めまい・肩こりには桂枝ブクリョウ丸（ケイシブクリョウガン）、ED（勃起障害）には八味地黄丸（ハチミジオウガン）、体力消耗が激しい症状には補中益気湯（ホチュウエッキトウ）が使用される [ 14 ]。

抗アンドロゲン剤の役割をするものはノコギリヤシが有名である。ノコギリヤシ（*Serenoa ripens*）は、ヤシ科の植物であり果実部分の研究が多くされている。有効成分は、植物ステロール（主に  $\beta$ -sitosterol）と脂肪酸であるという報告がある。5 $\alpha$ リダクターゼ阻害作用、核内のステロイドホルモンレセプターの遺伝子発現の抑制、レセプターとの結合阻害が報告されている [ 15 ] [ 16 ] [ 17 ]。前立腺疾病改善の場合はペボカボチャとの相乗効果などが推奨されている。今のところはっきりした活性成分やメカニズムについてはわかっていない。

アンドロゲン様作用を示すヘルスフードにはマツの花粉、チョウセンニンジンやダヴィディー（ユリ科の植物）が知られている。マツ（*Pinus* spp.）は米国では *P. sylvestris* と *P. tabulaeformis*、韓国では *P. koraiensis*、中国では *P. massonia* と *P. tabulaeformis* が主に使用されており、全てのマツの花粉にテストステロンが含まれている。他の化学成分は、主にブラシノステロイド類であり、ブラシノロイド、カスタステロン、タイファステロールなどがある。これらは化学構造がステロイド性ホルモンに類似するためステロイドのような働きが見られる。チョウセンニンジンにはポリアセチレン類、アルカロイド類、多糖類、製油成分、脂肪酸、ステロイド類、アミノ酸類、ペプチド類、ギンセノシド類などが含まれている。チョウセンニンジンに含まれるサポニンを使用した臨床実験で1日4gのチョウセンニンジンを経口摂取した被験者（男性）に血漿テストステロン、DHT、卵巣刺激ホルモン（FSH）や黄体形成ホルモン（LH）、そして精子の増加および運動性の向上が報告された。ラットやマウスを用いた動物試験でもテストステロンの着実な増加が認められており、含有成分のギンセノシドは強いLH分泌促進作用が確認された。LHが分泌されると男性の生体内ではテストステロンを増加するような刺激を受ける。

#### 1 - 6 本研究の目的

代表的な更年期障害症状である前立腺肥大症に着目すると、組織学的に 60 歳男性では 50%以上、85 歳までには約 90%に認められ、その 1/4 に排尿障害が出現する [ 18 ]。排尿障害は、頻尿、夜間頻尿、尿意切迫感などで、他覚的症状でなく、自覚的症状であるので自己判断で治療を選ぶため、推定患者数よりも通院している患者数が少ないと推定されている。例に挙げた前立腺肥大症のように加齢に伴い発生する男性更年期障害の諸症状は生命に関わらない場合が多いにせよ QOL を低下させていることは明らかである。

ヘルスフードは医薬品と異なり、食品であるので自己判断による摂取や日常的摂取が可能であり、QOL 改善への貢献度は高いが、現存する男性更年期障害に有効なヘルスフードの選択肢が少なく、メカニズムや有効物質など解明されていないものが多いのが現状である。

本研究では、ヘルスフードによる男性ホルモン調節する作用を示す新規食品素材の探索、その有効成分の単離と同定などを行い、ヘルスフードの 3 大要件である Mechanism, Evidence, Safety を満たすような食品素材を情報発信することにより社会貢献することを目的とする。



## 第2章 実験方法

### 2 - 1 研究方針

研究方針としては、大きく分けて *in vivo* と *in vitro* の系を行った。*in vivo* の系では古くからアンドロゲン検出に用いられているハーシュバーガーアッセイ [ 19 ] に改良を加えてサンプルが生体に対してアンドロゲン作用、または抗アンドロゲン作用を及ぼすか否かをマウスでスクリーニングした。*in vitro* では、スクリーニングにより探索した天然物サンプルがアンドロゲンに関連するかを確認するためにアンドロゲン依存性のあるヒト前立腺癌由来細胞の LNCaP 細胞 ( 筑波バイオリソースセンターより購入 ) 増殖への影響を観察した [ 20 ]

### 2 - 2 試薬、その他

99.5%特級エタノール(和光純薬), 一級メタノール(和光純薬), Testosterone propionate (和光純薬), 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone (和光純薬), 牛胎児血清 CS-FBS (GIBCO), 0.1% トリプシン EDTA (GIBCO), ジメチルスルオキシド (和光純薬), リン酸緩衝溶液 \* 1,

#### \* 1 リン酸緩衝液の調製

8.0 g の NaCl、2.9 g の Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、0.2 g の KCl および 0.2 g の KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を蒸留水 1L に溶解させ、高圧蒸気滅菌を行った [ 21 ]

### 2 - 3 実験動物の飼育と管理

実験動物は日本エスエルシー株式会社から購入した雄の SPF:ddY マウス (日本 SLC) の 7 週齢 (体重 28 ~ 31 g) を用いた。マウスは飼育室にて 12 時間の明暗サイクル (明期 8:00 ~ 20:00)、温度 25 ± 0.5、湿度 60 ± 3%、飼料 (MR ストック、日本農産工業株式会社製) と水は自由摂取という条件で飼育した [ 22 ]。本研究では、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号) に遵守し、動物実験を行った。

## 2 - 4 男性更年期モデルマウスを用いた試験 (*in vivo*)

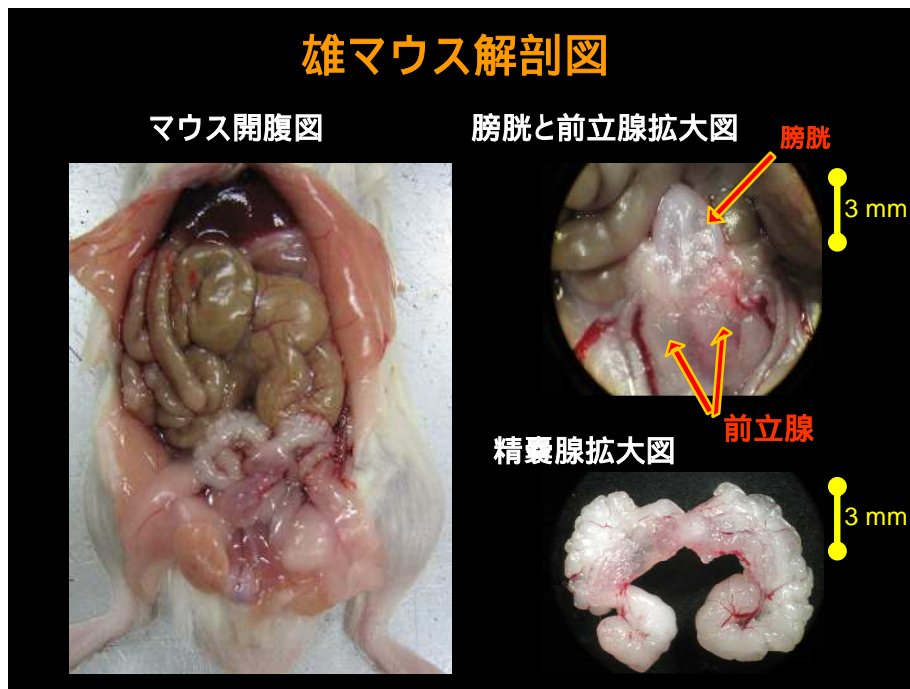
ハーシュバーガーアッセイはアンドロゲンによって雄動物の副生殖器（前立腺、精嚢腺等）が肥大することを利用して化学物質がアンドロゲン様作用を有するか検出する試験方法である [ 2 3 ]。この試験方法はラットを用いるのが一般的であるが、本研究ではマウス用に改良を加えて試験系を確立した。

マウスに去勢を行い、生体内でのテストステロン産生の個体差をなくした後に、去勢マウスに外部から一定量のテストステロンを加えることで意図的に前立腺を肥大させたマウスを作成して男性更年期モデルマウスとして実験に用いた。

### 【実験方法】

マウスに全身麻酔を施し、陰嚢部より精巣を摘出（去勢）してテストステロンを産生できない状態をつくり、そこに一定量のコーン油に溶解させたプロピオン酸テストステロンを腹腔内投与して、モデル動物とした [ 2 4 ]。これを男性更年期マウスとして *in vivo* 試験を行った。10日間、1日1回 2.0 mg/kg プロピオン酸テストステロン腹腔内投与（i.p.）と蒸留水に溶解させた天然物サンプルまたはポジティブコントロールを強制経口投与（p.o.）して、その後解剖を行い、前立腺の大きさと精嚢腺重量を測定して評価をした。本来ならば、前立腺も重量評価が望ましいが、マウスの前立腺は小さいため取り出すことが困難だったのでノギスで縦を長径、横を短径として大きさを測定した（図4）。前立腺と精嚢腺はアンドロゲン依存性のある臓器であり、アンドロゲンなしでは成長・維持ができない。サンプル投与により前立腺の大きさ、精嚢腺重量が減少していれば抗アンドロゲン作用、増加していればアンドロゲン様作用があると考えた。結果の値は平均±標準誤差で表した。各群間の有意差は Student's *t-test* によって評価し、 $p < 0.05$  を統計的に有意であるとした。

A.



B.

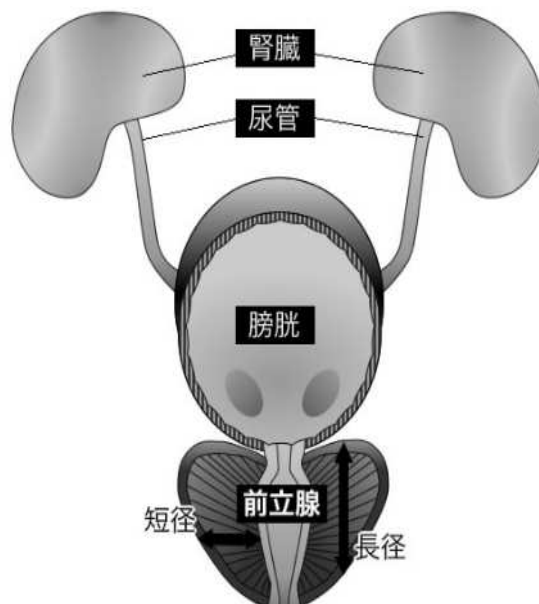


図 4 A. マウスの解剖図 B. 前立腺の短径および長径

#### 2 - 4 - 1 Finasteride 投与による前立腺大きさおよび精嚢腺重量への影響

この実験系がアンドロゲン関連の作用検出に適切かどうかを確認するために、ポジティブコントロールとして 5 $\alpha$ -リダクターゼ阻害剤である Finasteride [ 25 ] を用いて試験を行った。Finasteride 投与群に 0.1 mg/kg ( fina 0.1 ), 0.5 mg/kg ( fina 0.5 ), 2.5 mg/kg ( fina 2.5 ) を強制経口投与、Control 群 ( TP ) と Finasteride 投与群は 2.0 mg/kg のプロピオン酸テストステロン ( TP ) 投与を行い、TP が、前立腺大きさおよび精嚢腺重量に影響することを確認するため、去勢手術のみの群を cas とした。

図 5 の結果より、Finasteride は全ての濃度において前立腺大きさおよび精嚢腺重量を有意に減少させていた。精嚢腺重量では濃度依存性も確認された。よって男性更年期モデルマウスを用いた試験で Finasteride はポジティブコントロールとして有効であることが示唆された。

#### 【図 5】

cas : 去勢のみ

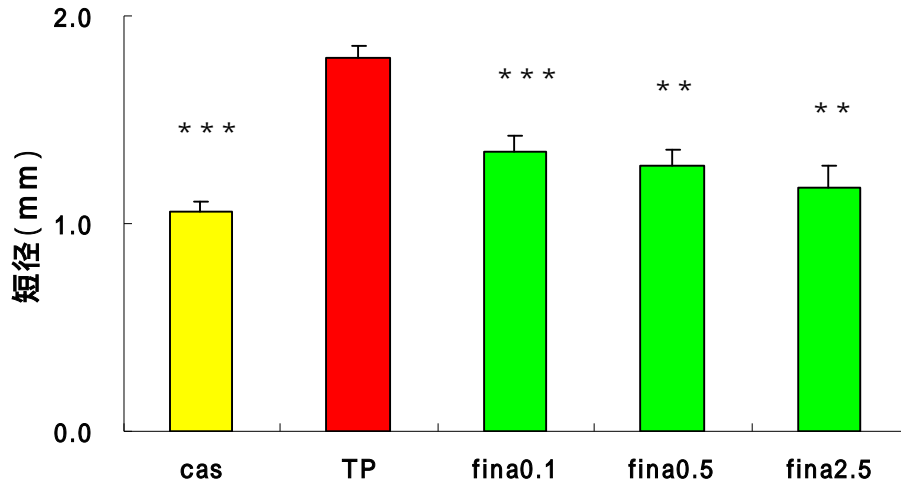
TP : 去勢 + TP ( 2.0 mg/kg ) i.p.

Fina0.1 : 去勢 + TP ( 2.0 mg/kg ) i.p. + Finasteride ( 0.1 mg/kg ) p.o.

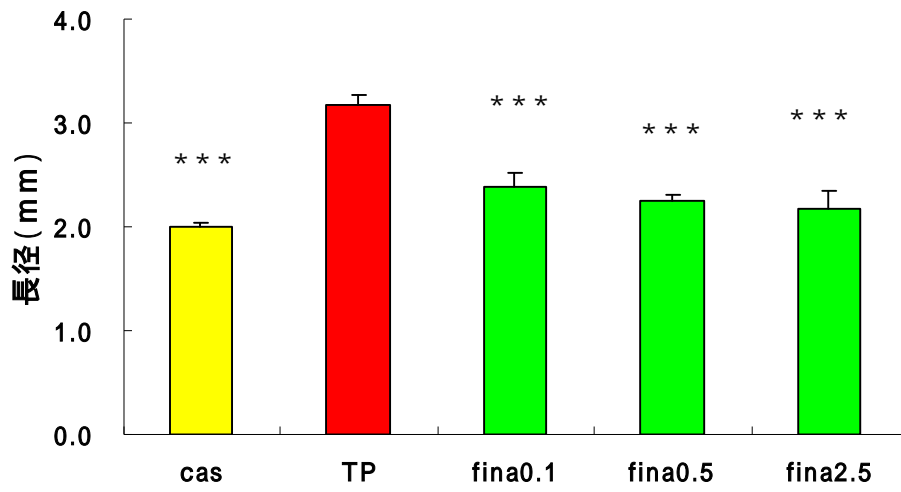
Fina0.5 : 去勢 + TP ( 2.0 mg/kg ) i.p. + Finasteride ( 0.5 mg/kg ) p.o.

Fina2.5 : 去勢 + TP ( 2.0 mg/kg ) i.p. + Finasteride ( 2.5 mg/kg ) p.o.

A.



B.



C.

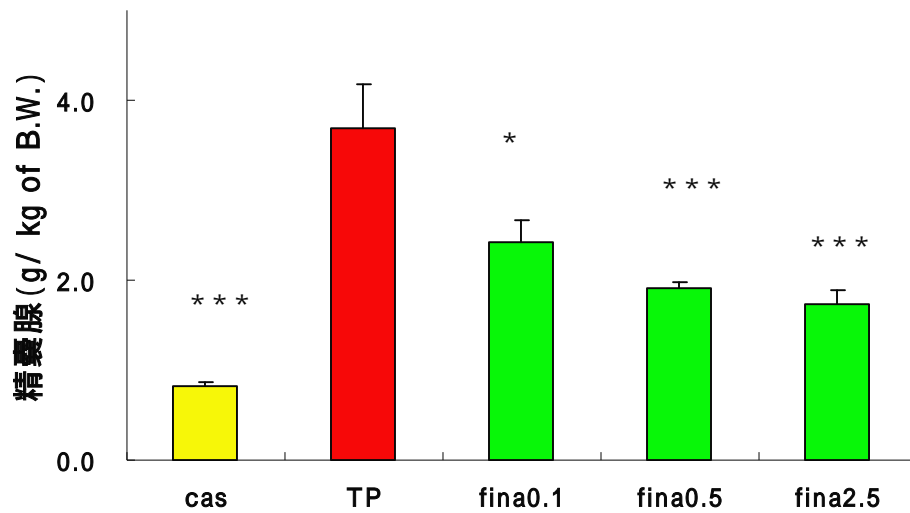


図 5 Finasteride 投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

#### 2 - 4 - 2 去勢マウスと非去勢マウスの感受性の比較

去勢をしない場合、内因性のテストステロンが存在するので、視床下部 - 下垂体 - 精巣におけるフィードバック系が働くため副生殖器の肥大が生じ難いことや非去勢ラットよりも去勢したラットの感受性が高いことが報告されている [ 2 3 ]。これを確認するために去勢マウスと非去勢マウスにポジティブコントロールとして Finasteride と Flutamide を投与する試験を行った。

去勢マウスと非去勢マウスそれぞれに 0.5mg /kg の Finasteride ( fina ), 10mg/ kg の Flutamide( flu )を強制経口投与した。去勢したマウスには、Control 群( TP )、Finasteride 投与群および Flutamide 投与群は 2.0 mg/kg のプロピオン酸テストステロン ( TP ) 投与を行い、TP が、前立腺大きさおよび精囊腺重量に影響することを確認するため、去勢手術のみの群を cas とした。非去勢マウスの Control 群はサンプルを投与していないマウス( nomal 群 )とした。

図 6 の結果より、去勢を行ったマウスでは、Finasteride と Flutamide 投与によりで前立腺大きさおよび精囊腺重量を有意な減少または減少傾向が確認させた。図 7 の非去勢マウスでは S.E. が大きく、前立腺大きさで有意な差が見られなかった。精囊腺重量において Finasteride 投与群のみに有意な減少が確認された。以上の結果より、去勢を行うと感受性が高くなることが示唆されたので、本研究の実験系では去勢を行うことを推奨した。

#### 【図 6】

normal : 去勢のみ

fina : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + Finasteride (10 mg/kg) p.o.

flu : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + Flutamide (0.5 mg/kg) p.o.

#### 【図 7】

normal : 去勢のみ

fina : 去勢 + Finasteride (10 mg/kg) p.o.

flu : 去勢 + Flutamide (0.5 mg/kg) p.o.

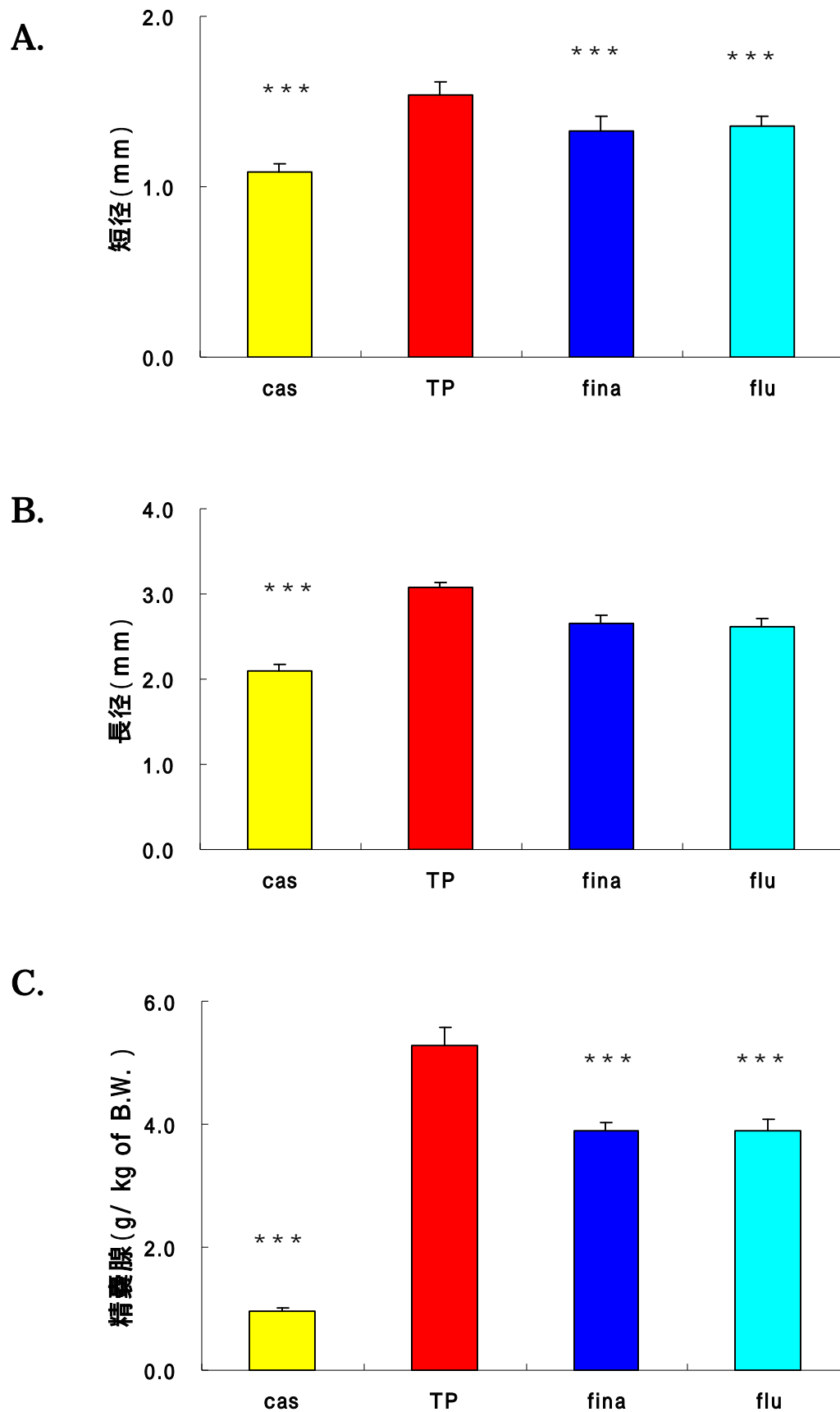
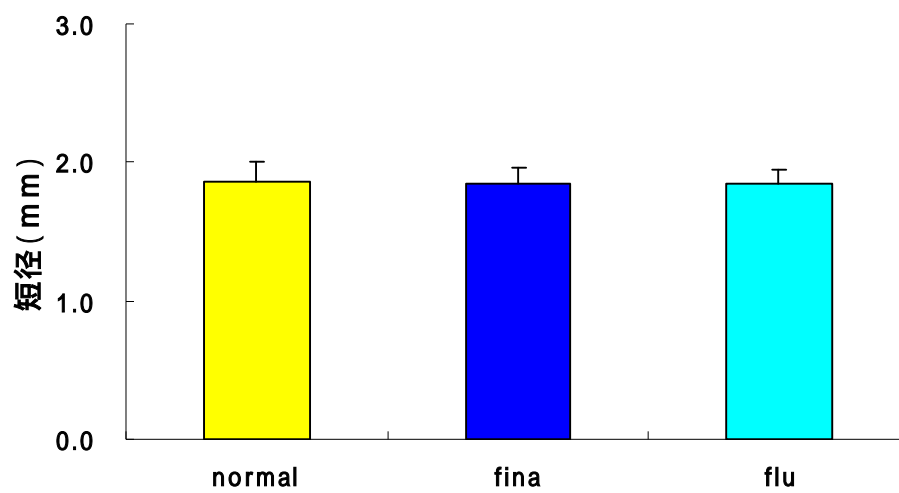


図 6 去勢マウスへ Finasteride および Flutamide 投与時の各臓器への影響

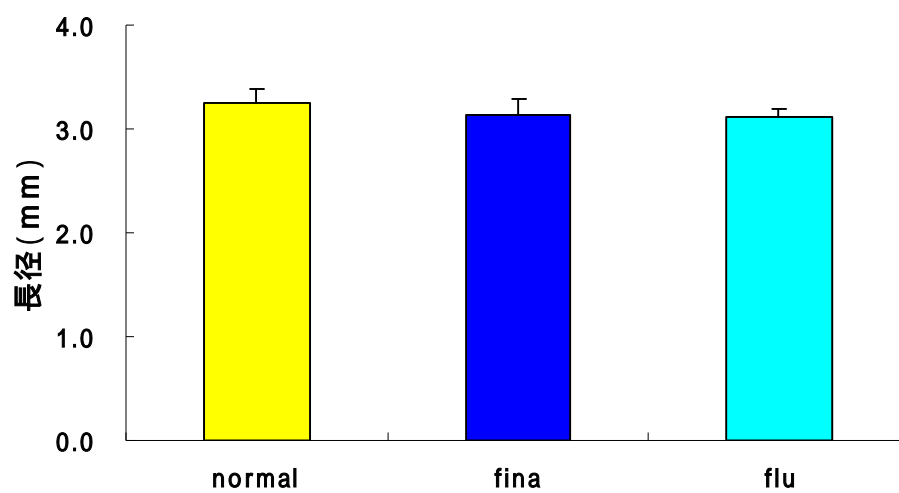
Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

A.



B.



C.

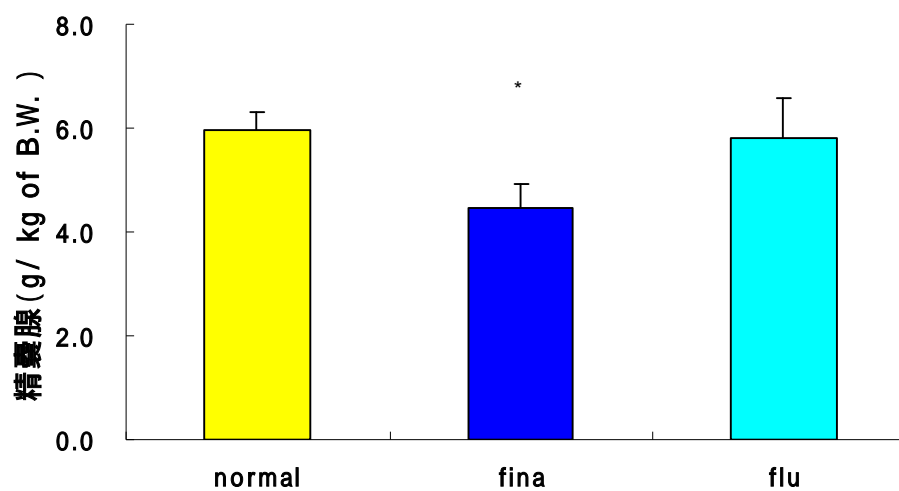


図 7 非去勢マウスへ Finasteride および Flutamide 投与による各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$  vs Control (normal)



## 2 - 5 LNCaP 細胞を用いた細胞増殖試験 ( *in vitro* )

ヒト前立腺癌細胞由来培養細胞株 LNCaP 細胞 ( 図 8 ) を 5% ウシ胎児血清 ( FBS ) 含む RPMI 1640 培地で培養した。細胞培養の方法についてはこれまで報告されている論文 [ 25, 26 ] を参考にして行った。LNCaP 細胞はアンドロゲン依存的に増殖する特徴のあるステロイドホルモン関連の試験によく使われる細胞である。FBS にはわずかながらステロイドホルモンが含まれているので、ステロイドホルモンの影響を避けるために、ステロイドホルモンを活性炭処理により除去した CS-FBS ( charcoal stripped-FBS ) を使用した。LNCaP 細胞は、筑波バイオリソースセンターより入手した。

### 【実験方法】

滅菌済み 96 well plate ( Corning Inc. ) に LNCaP 細胞を  $1.0 \times 10^4$  cell/ well になるようにまき、そこへ評価するサンプルを添加した。サンプルを添加していないものをコントロールとして、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件においてインキュベーター内で培養させ、3 日後に MTT assay を用いて 96 well plate を処理した。570 nm で吸光度を測定することにより細胞の増殖を評価した [ 28 ]

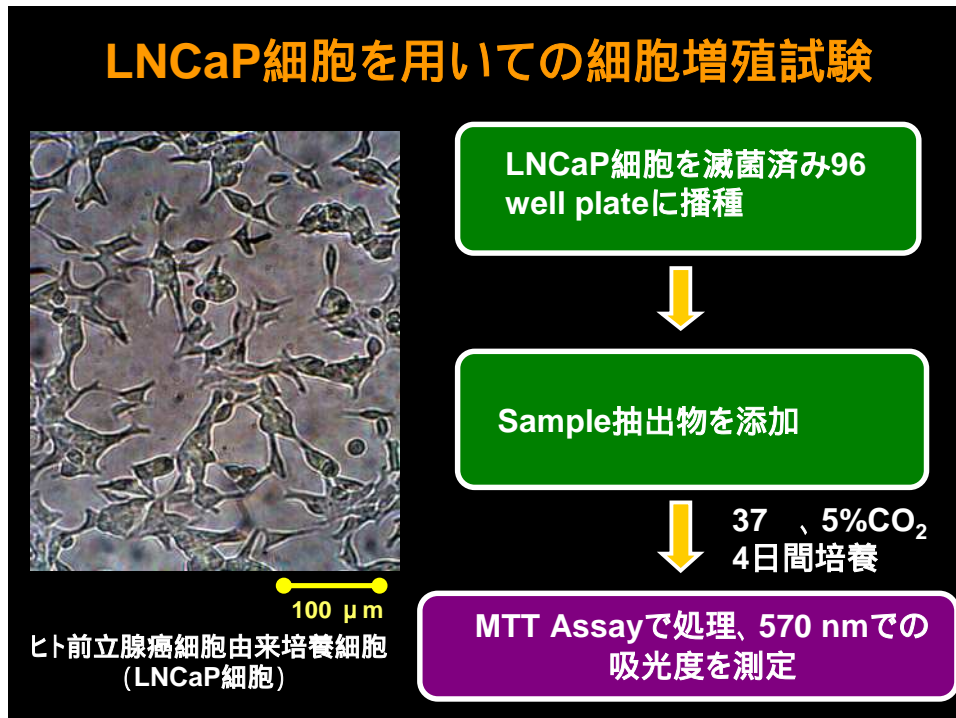


図 8 LNCaP 細胞試験

## 2 - 6 有効成分の単離・精製

### 2 - 6 - 1 単離・精製の基本操作

溶媒の濃縮は、ダイヤフラム真空ポンプの減圧下（30～50 mmHg）、ロータリーエバポレーターを用い、水浴温度 20～30 で行った。水の濃縮は凍結乾燥によって行った。溶媒類は市販の特級および HPLC 用を用いた。

### 2 - 6 - 2 クロマトグラフィー

#### ( a ) カラムクロマトグラフィー

ODS シリカゲルは(株)ナカライテスク製のシリカゲル Cosmosil 75C18-OPN を用いた。

順相シリカゲルは(株)メルク製のシリカゲル 60 を用いた。

#### ( b ) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

目的とする成分の分析および分取には、日光分光(製)の送液ポンプ PU-2089i plus 型装置および紫外分光光度計 UV-2070i plus 型装置を用いた。カラムは野村化学(株)製 Develosil ODS HG-5 または Develsil 30-5 を用いた。

#### ( c ) 分析用薄層クロマトグラフィー (TLC)

E Marck 社製 TLC プレート、ODS RP-18WF<sub>254S</sub>(Art. 1.13124)を用いた。化合物の検出は、UV (254nm) の照射と、*p*-アニスアルデヒドの含有エタノール溶液 (95%エタノール 500 ml、*p*-アニスアルデヒド 13.7 ml、濃硫酸 18.4 ml、酢酸 5.6ml により調製) に浸し、ホットプレート上で加熱発光させることにより行った。

## 2 - 7 機器分析

### 2 - 7 - 1 $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H}$ NMR)

ブルガー (株) AV400M 型装置 (400MHz) を用いて測定し、以下の様式で記載した。 $^1\text{H}$  NMR (測定周波数、測定溶媒) 化学シフト値 (多重度、スピン結合定数、水素数)

化学シフト値は測定溶媒の残留プロトンのシグナルを内部標準 [ $\text{CD}_2\text{HOD}$  (3.30 ppm)] として、ppm で記載した。多重度は s (単一線) d (二重線) t (三重線) q (四重線) m (多重線あるいは複雑に重なったシグナル) と略記した。スピン結合定数  $J$  は Hz で記載した。

### 2 - 7 - 2 $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル ( $^{13}\text{C}$ NMR)

ブルガー (株) AV400M 型装置 (100 MHz) を用いて測定し、以下の様式で記載した。

$^{13}\text{C}$  NMR (測定周波数、測定溶媒) 化学シフト値 (多重度)

化学シフト値は測定溶媒のシグナルを内部標準 [ $^{13}\text{CD}_3\text{OD}$  (49.5 ppm)] として、ppm で記載した。多重度は HMQC スペクトルより推定し、s (四塩化炭素) d (メチン炭素) t (メチレン炭素) q (メチル炭素) と略記した。

### 2 - 7 - 3 二次元核磁気共鳴スペクトル

ブルガー (株) AV400M 型装置 (400MHz) を用いて、以下の条件で測定した。

- (1) COSY : データポイント数 (512 × 128)
- (2) HMQC : データポイント数 (512 × 128) ,  $\Delta t = 1/2J = 180 \text{ ms}$  [ $^1J_{\text{CH}} = 145 \text{ Hz}$ ]
- (3) HMBC : データポイント数 (512 × 128) ,  $\Delta m = 1/2J = 83 \text{ ms}$  [ $^{2,3}J_{\text{CH}} = 6 \text{ Hz}$ ]
- (4) DEPT : データポイント数 (512 × 128)

### 第3章 パナナ (*Musa. Spp*) の抗アンドロゲン作用に関する研究

#### 3 - 1 天然物サンプルスクリーニング結果

男性更年期障害モデルマウスを用いたスクリーニングを行った。10 日間サンプルと TP 2.0mg/ kg/ day を投与した結果いくつかのアンドロゲン作動性を有するサンプルを発見した。その中でも、活性の強さなどを考慮した結果、抗アンドロゲン作用を有するサンプルとしてバナナ皮の研究を進めた。

表 1 スクリーニングサンプル一覧

- アンドロゲン作用が確認されたサンプル
- 抗アンドロゲン作用が確認されたサンプル

Finasteride (ポジティブコントロール)	ルコウアサガオ (種)
Flutamide (ポジティブコントロール)	タツアイ (種)
ヒュウガナツ (葉)	サクラ (葉)
メタセコイア	オクラ (葉)
マジョレナ	グミ (葉)
パイナップル (葉)	タラノメ (葉)
アニス	アジョワン
フェネル	ペポカボチャ種子
ブラックシード	ペポカボチャ種子熱水抽出
プロッコリースプラウト	ピンクペッパー
カルダモン	タラゴン
レモン (葉)	ヒース
ツノマタ	トマト (葉)
スギノリ	マローブルー
擬足多棘蟻	アコヤガイ
ウミウチワ	伊豆サンプル 13
アカジソ	伊豆サンプル 17

アカザ	アラメ
ココナツ(皮)	神馬藻
ココナツ(内皮)	マツモ
マタタビ	アカモク
キンモクセイ(葉)	カジメ
メース	L.digaitata
ハナミズキ(葉)	ナガマタ
ユズ(葉)	タンカン(葉)
オールスパイス	シークワサー(葉)
コリアンダー	6-MSITC
アンジェリカ	パスチャカ
紅葉苔	マカ
アジザイ(葉)	ゴボウスプラウト
マスティック	キャベツスプラウト
テイキンザクラ(葉)	フェニックス(葉)
海ブドウ	オクラスプラウト
ラカンカ	ゴーヤスプラウト
山クラゲ	ミズナスプラウト
バナナ皮	ソバスプラウト
バナナ実	ヒマワリスプラウト
バナナ茎	コマツナスプラウト
バナナ仮茎	チンゲンサイスプラウト
バナナ果軸	6-MITC
バナナ葉柄	サンジャクバナナ(葉)
バナナ葉	サンジャクバナナ(茎)
オリゴノール	サンジャクバナナ(根)
フサゴカイ	ハチノコ
VALERIANA CORTE TE	セミ幼虫
レンブ(葉)	カイコサナギ
クロナマコ	イレイセン
アイスクリームの木	トシシ
ムラサキ(カルス)	ゴシツ
シワヤハズ	コツサイホ
ヘチマ(カルス)	センキュウシツ
Laminaria Sacchakina	サンシチカ

モモタマナ(仁)	ドクダン
シトステロール	ドッカツ
カンペステロール	ツウソウ
スチグマステロール	カメムシ
ノコギリヤシエキス	ケラ

### 3 - 2 バナナ (*Musa* spp.) とは

バナナ (*Musa* spp.) は、シヨウガ目バシヨウ科バシヨウ属の多年生草本である。バナナは高温多湿の条件を好み、生育最適温度は 29~31 で熱帯から亜熱帯に広く分布する。食用バナナの種子は消失しており、繁殖は株分けなどにより行われる [ 2 9 ]

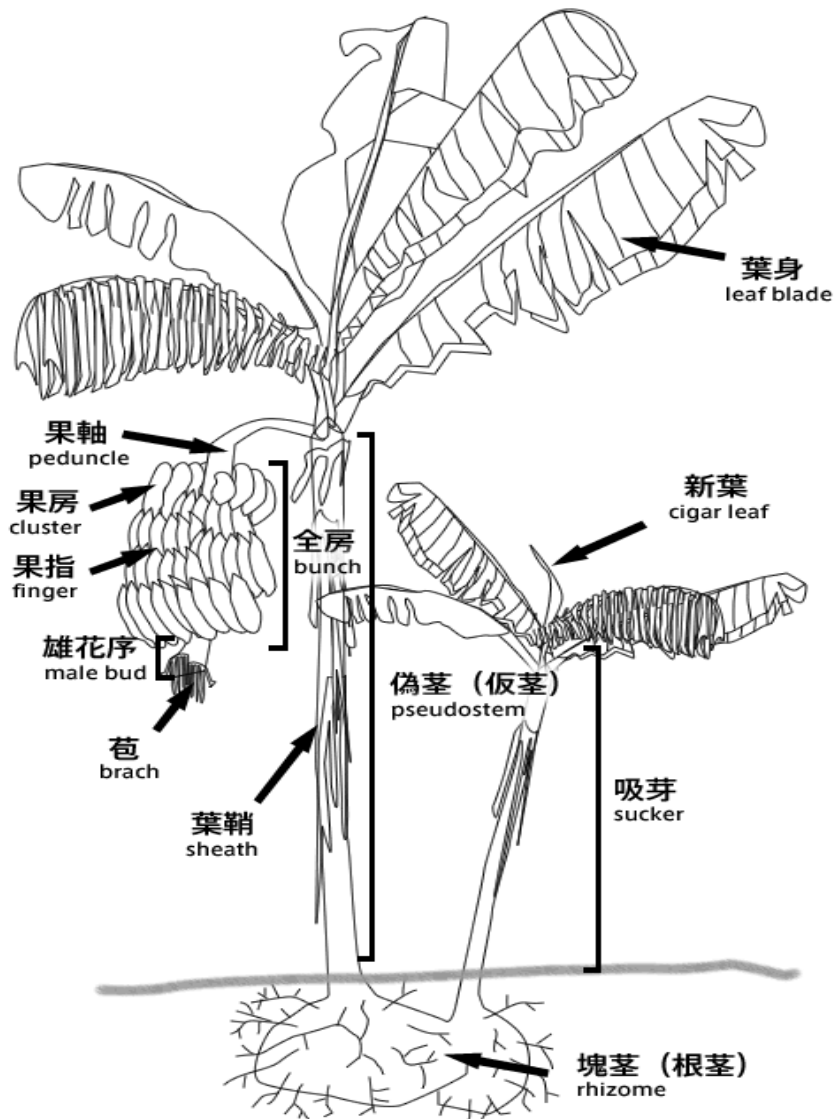


図 9 バナナの全体

### 3 - 3 バナナの皮抽出物投与のマウスに及ぼす影響

株式会社ヒロインターナショナルから入手した有機栽培バナナ（フィリピン産）を手で可食部と皮に分けて、皮を流水でよく洗った後、切り刻み粗切物として10倍量の1級メタノールに3日間浸漬させてろ過を行いエバポレーターにて減圧乾固させたものをサンプルとして利用した。

バナナの皮抽出物投与群にバナナ皮抽出物 100 mg/kg（バナナ皮）を強制経口投与、Control 群（TP）とバナナの皮抽出物投与群は 2.0 mg/kg のプロピオン酸テストステロン（TP）投与を行い、TP が、前立腺大きさおよび精嚢腺重量に影響することを確認するため、去勢手術のみの群を cas とした。

図 10 の活性試験の結果より、バナナ皮抽出物で前立腺大きさに有意な減少が確認された。

#### 【図 10】

cas：去勢のみ

TP：去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p.

バナナ皮：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + バナナ皮抽出物 (100 mg/kg) p.o.



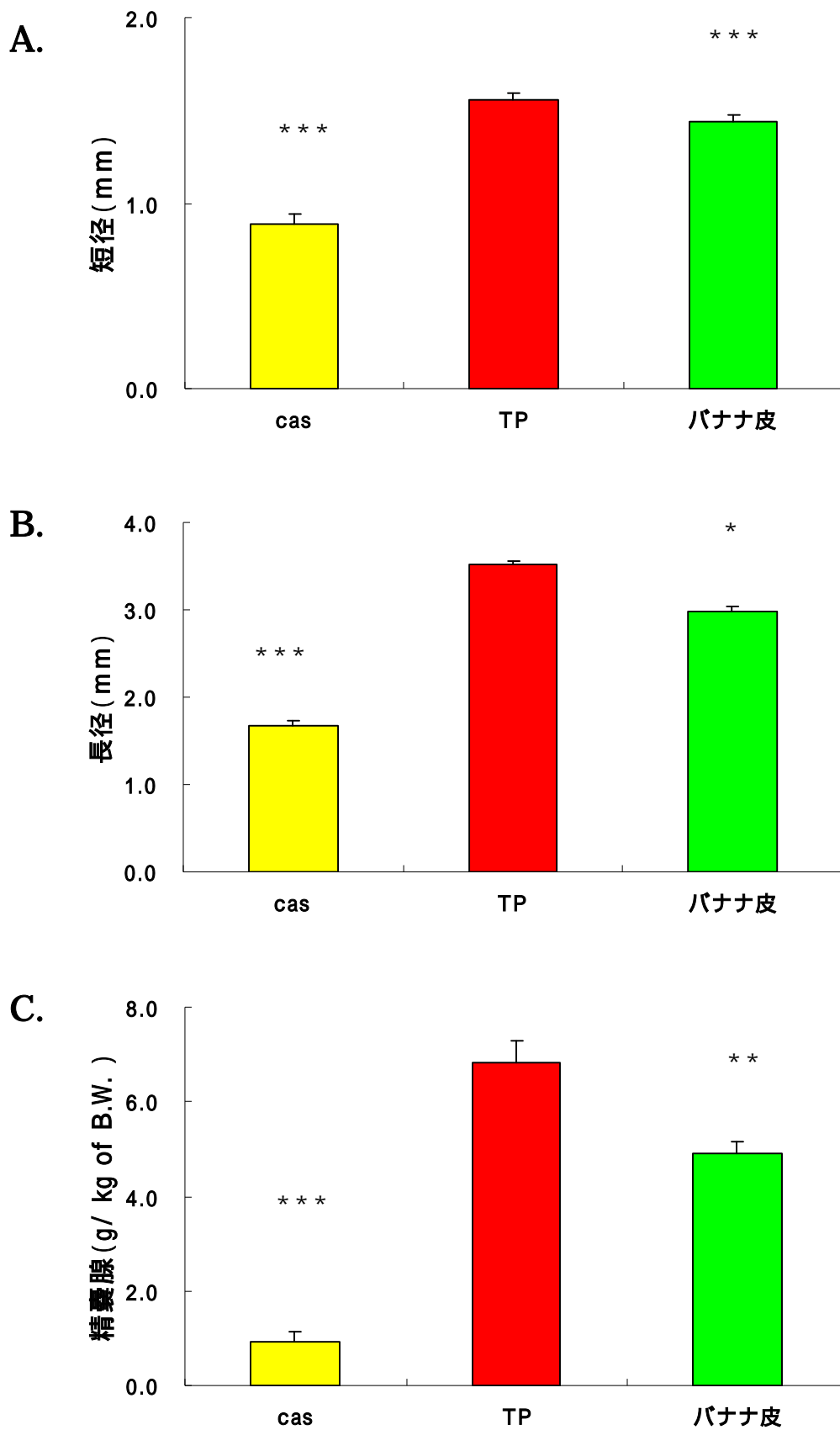


図 10 バナナの皮抽出物投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

### 3 - 4 バナナ皮の抗アンドロゲン活性成分の単離および同定

#### 3 - 4 - 1 バナナ皮の分画

活性が確認されたフラクション

括弧内の数字は収率を表す

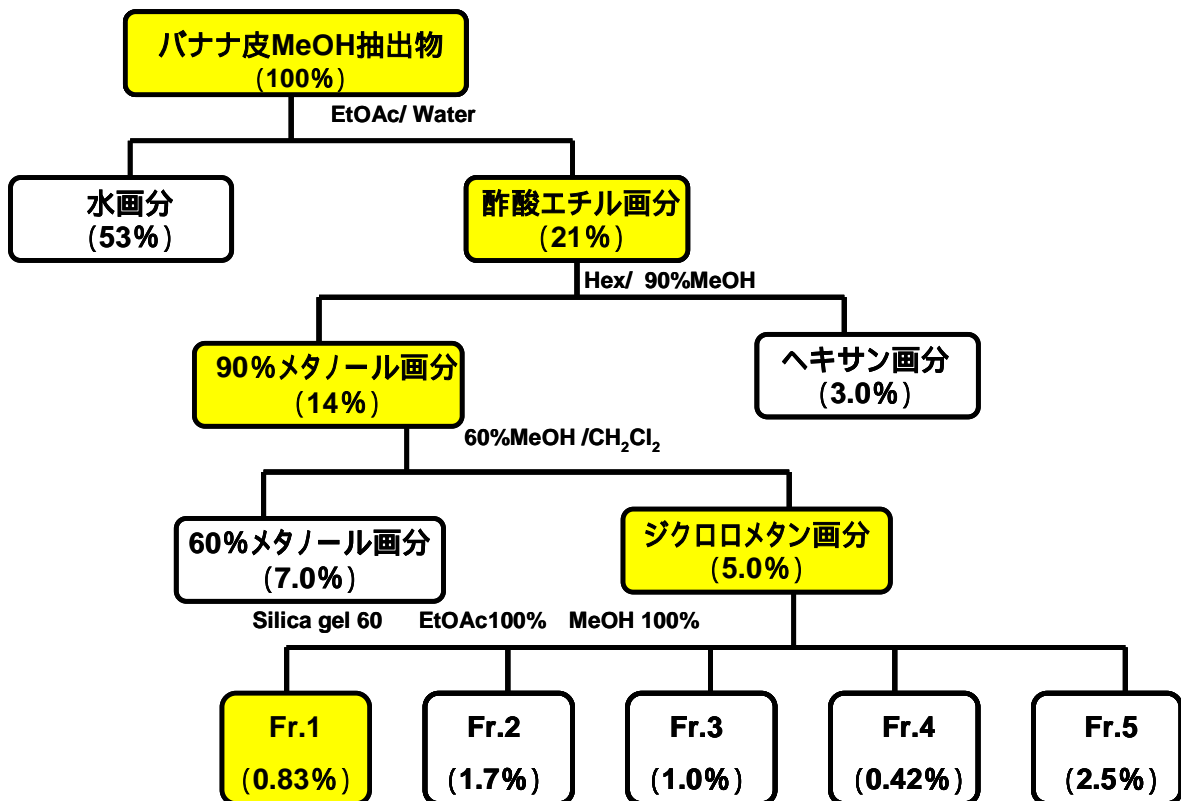


図 11 バナナ皮抽出物からの活性成分分画スキーム

バナナ皮メタノール抽出物を二液分配法により分画して、水、60%メタノール、ヘキサン、ジクロロメタンの4つに分けて、これらをエバポレーターで減圧乾固させてマウスに投与して活性試験を行った。本研究室で行った試験より、ジクロロメタン画分に活性が確認されたので、ジクロロメタン画分を薄層クロマトグラフィー（TLC）で展開液の条件検討を行った後に、シリカゲルオープンカラムを用いてFr. 1～Fr. 5の5つの画分を得た（図11）。これらをエバポレーターで減圧乾固させてマウスに投与して活性試験を行った。

分画物投与群に Fr. 1 (8.3 mg/kg), Fr. 2 (17 mg/kg), Fr. 3 (10 mg/kg), Fr. 4 (4.2 mg/kg), を強制経口投与、Control 群（TP）と分画物投与群は 2.0 mg/kg のプロピオン酸テストステロン（TP）投与を行い、TP が、前立腺大きさおよび精嚢腺重量に影響することを確認するため、去勢手術のみの群を cas とした。

図 12 の活性試験の結果より、短径では Fr.1 と Fr.2、長径では Fr.1 と Fr.4 に有意な前立腺大きさの減少が確認された。精嚢腺重量で Fr. 1 に有意な減少が確認された。以上の結果より Fr. 1 の分画を進めた。

#### 【図 12】

cas：去勢のみ

TP：去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p.

Fr.1：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + Fr.1 (8.3 mg/kg) p.o.

Fr.2：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + Fr.2 (17 mg/kg) p.o.

Fr.3：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + Fr.3 (10 mg/kg) p.o.

Fr.4：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + Fr.4 (4.2 mg/kg) p.o.

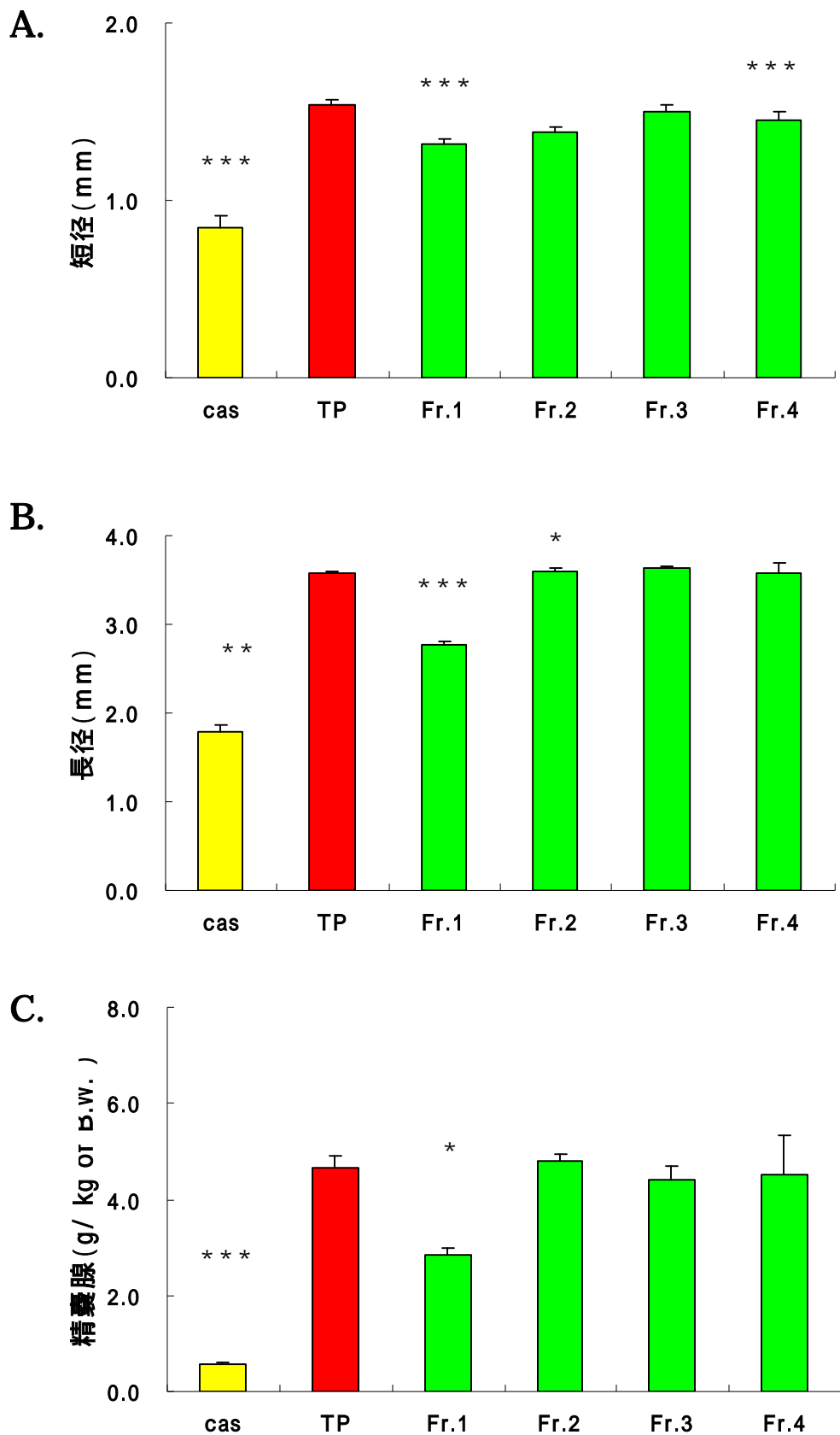


図 12 バナナ皮分画物 Fr.1 ~ Fr.4 投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

Fr.1 に活性が確認されたので、TLC で展開液の条件検討を行った後に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて流速 5 ml/min で分画を行った（図 13）。図 14 のようなチャートが確認されたので、これを Fr. 1-1 ~ Fr. 1-5 に分けて採取して、エバポレーターで減圧乾固させた。Fr. 1-5 は少量だったため、Fr. 1-4 と混ぜた。

活性が確認されたフラクション

括弧内の数字は収率を表す

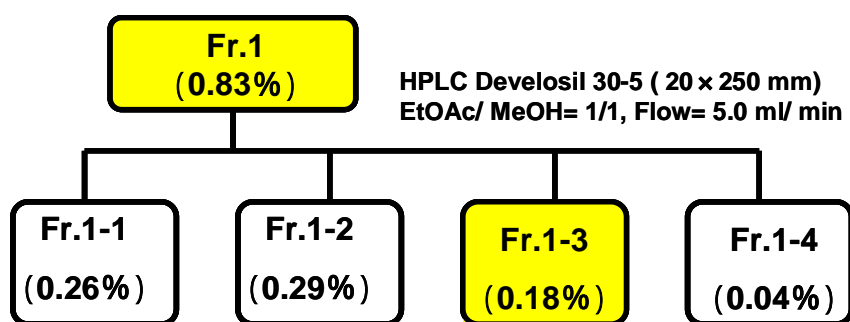


図 13 パナナ皮 Fr. 1 の分画スキーム

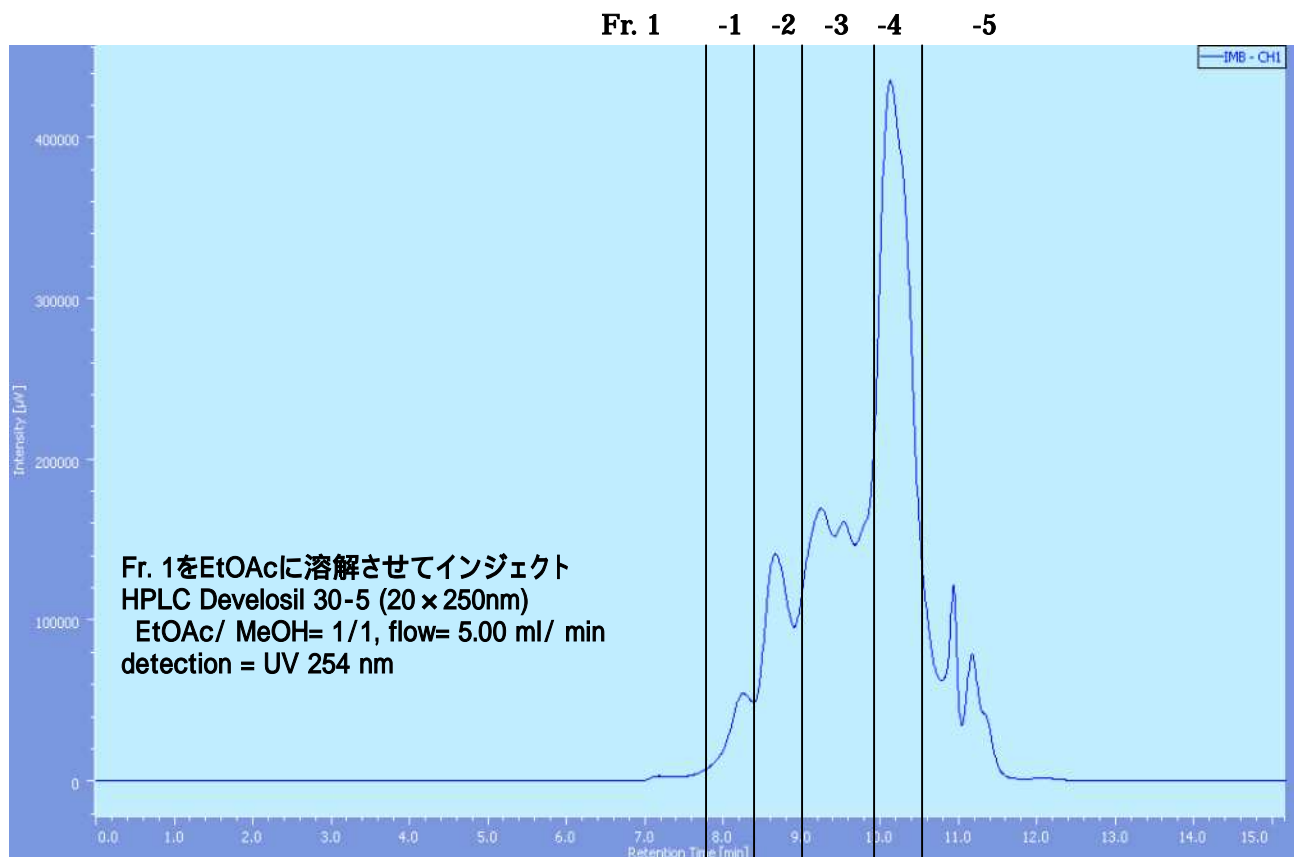


図 14 図 13 で得られた Fr. 1 の分離で得られた HPLC チャート

Fr. 1-1 ~ Fr. 1-5 について LNCaP 細胞で細胞試験を行い、細胞増殖を観察した。

図 15 の細胞試験の結果より、Fr. 1-3 に増殖抑制作用が確認されたので、Fr. 1-3 の分画を進めることにした。

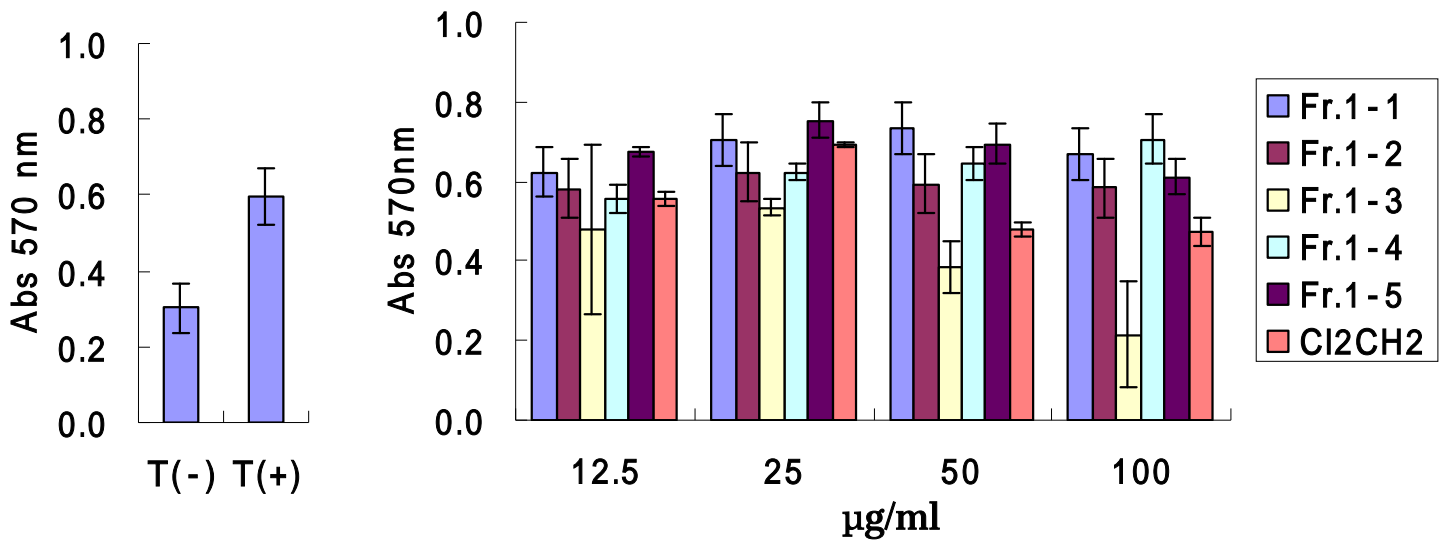


図 13 バナナ皮分画物 Fr.1-1 ~ Fr.1-5 添加による LNCaP 細胞増殖への影響 ( $n=2$ )

Fr.1-3 に活性が確認されたので、TLC で展開液の条件検討を行った後に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて流速 5ml/ min で分画を行った（図 16）。図 17 のようなチャートが確認されたので、Fr. 1-3-1 ~ Fr. 1-3-3 に分けて採取して、エバポレーターで減圧乾固させた。

  活性が確認されたフラクション

括弧内の数字は収率を表す

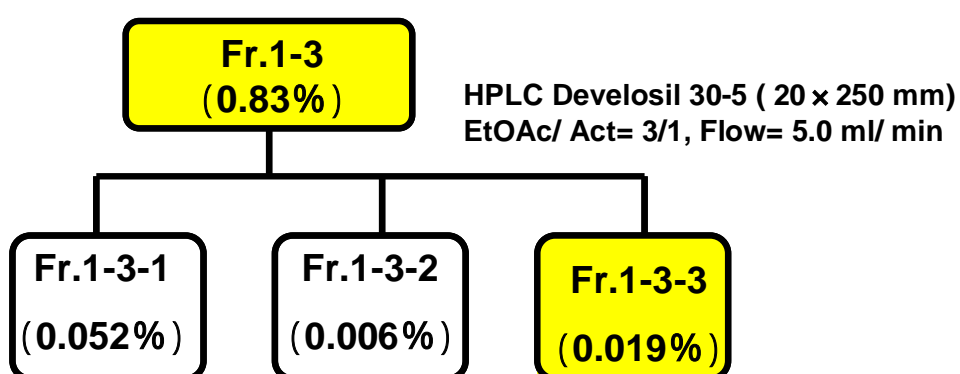


図 16 パナナ皮 Fr. 1 - 3 の HPLC スキーム

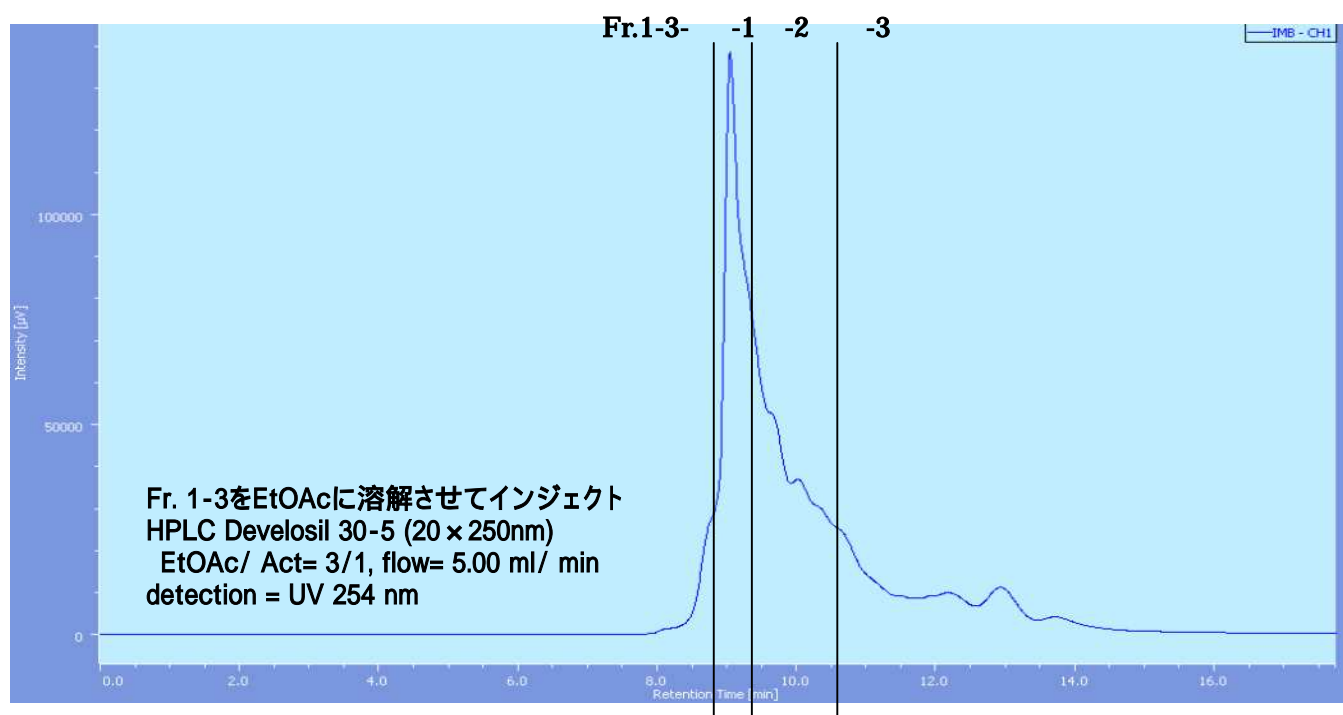


図 17 図 16 で得られた Fr. 1-3 の分離で得られた HPLC チャート

Fr. 1-3-1 ~ Fr. 1-3-3 で LNCaP 細胞で細胞試験を行い、細胞増殖を観察した (図 18)。Fr. 1-3-1 ~ Fr. 1-3-3 の中で Fr. 1-3-1 と Fr. 1-3-2 に細胞増殖抑制が確認された。どちらともに活性成分が含まれる。もしくは活性成分がいくつかあると示唆された。今回は量が多い Fr. 1-3-1 について研究を進めた。

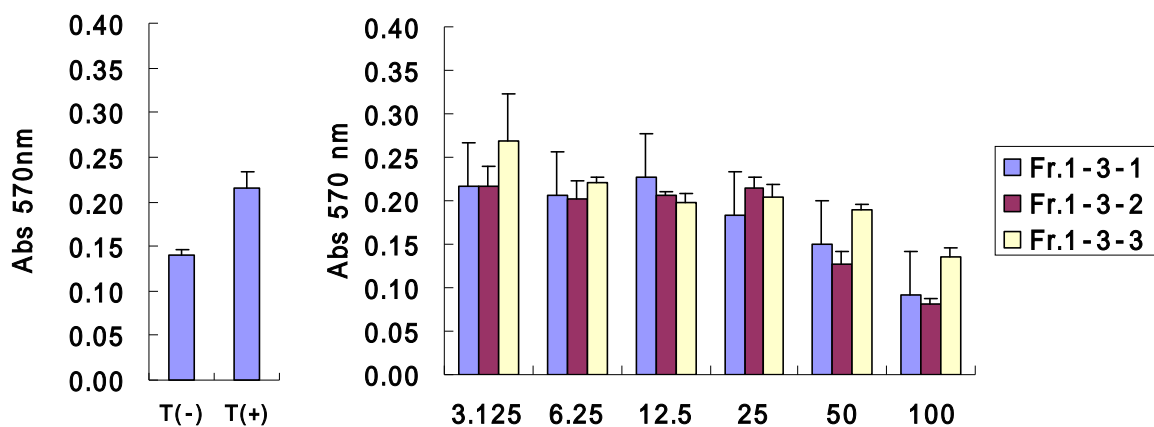


図 14 Fr.1-3-1 ~ Fr.1-3-3 添加による LNCaP 細胞増殖への影響 (n=2)



### 3 - 4 - 2 活性成分の構造決定

各種 NMR の解析データと文献値を照合した結果、Fr.1-3-1 は cycloeucalenone であると決定した [ 2 3 ]。なお、スペクトルデータと構造決定の詳細については巻末の添付資料に示した。

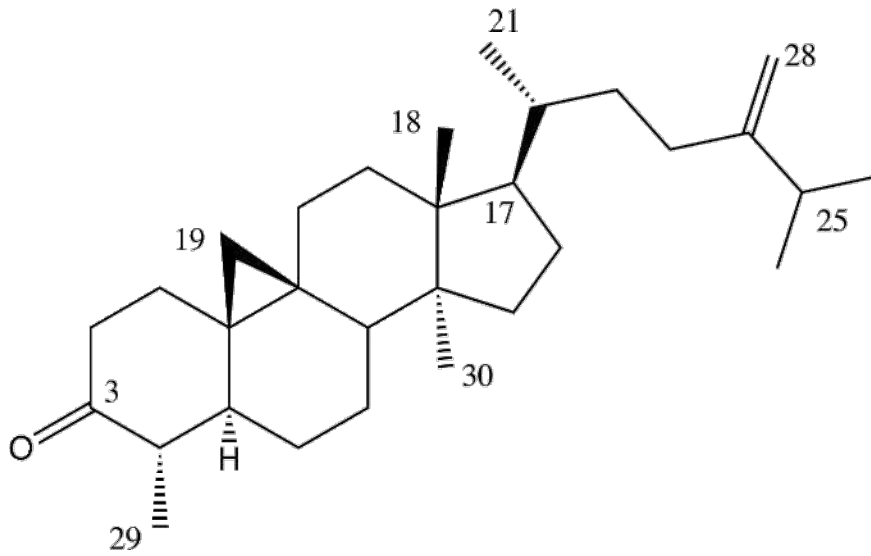


図 15 cycloeucalenone 計算値 (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O, Molecular Weight: 424.7015)

### 3 - 4 - 3 精製した活性成分を用いた活性試験

精製した cycloeucaleanone とバナナ皮メタノール抽出物を *in vivo* で評価を行った。cycloeucaleanone 投与群に cycloeucaleanone 0.5 mg/kg ( cycloeu ) バナナの皮抽出物投与群にバナナ皮抽出物 100 mg/kg ( バナナ皮 ) を強制経口投与、Control 群 ( TP ) cycloeucaleanone 投与群とバナナの皮抽出物投与群は 2.0 mg/kg のプロピオン酸テストステロン ( TP ) 投与を行った。

図 20 の活性試験の結果より、バナナ皮抽出物と cycloeucaleanone に有意な前立腺の大きさおよび精嚢腺重量の減少が確認された。

#### 【図 20】

TP : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p.

バナナ皮 : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + バナナ皮抽出物 (100 mg/kg) p.o.

cycloeu : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + cycloeucaleanone (0.5 mg/kg) p.o.

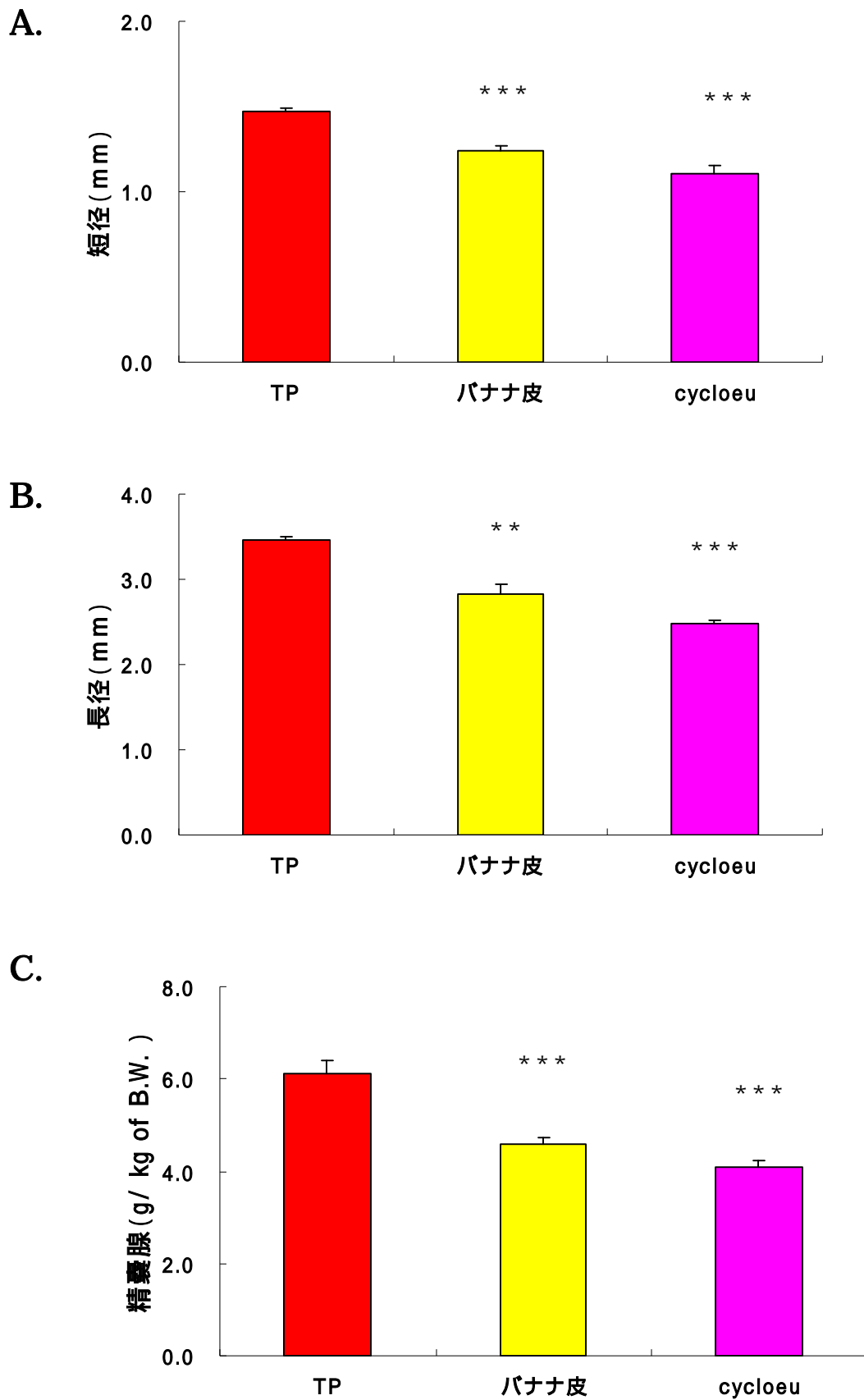


図 16 Cycloocalenone 投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

### 3 - 5 バナナ皮抽出物の DHT 投与マウスへの影響

今まではアンドロゲンとしてモデルマウスにテストステロンを投与していたが、メカニズムを推定するために DHT を投与して試験を行った。DHT はコーン油に溶解させて 1 日 1 回 6.0 mg/kg を腹腔内投与した。バナナ皮抽出物(100 mg/kg)、ポジティブコントロールとして Finasteride 0.5 mg/kg (fin 0.5), Flutamide 10 mg/kg (flu 10)をそれぞれ強制経口投与した。

図 21 の活性試験の結果より、Flutamide 投与群のみに有意な前立腺肥大抑制作用が確認された。バナナ皮抽出物投与群では活性は確認されず Finasteride 投与群と同様の挙動を示したことから、バナナ皮抽出物のメカニズムの 1 つとして 5 $\alpha$  リダクターゼ阻害が考えられる。

#### 【図 21】

DHT : 去勢 + DHT (6.0 mg/kg) i.p.

Fin 0.5 : 去勢 + DHT (6.0 mg/kg) i.p. + Finasteride (0.5 mg/kg) p.o.

Flu 10 : 去勢 + DHT (6.0 mg/kg) i.p. + Flutamide (10 mg/kg) p.o.

バナナ皮 : 去勢 + DHT (6.0 mg/kg) i.p. + バナナの皮抽出物(100 mg/kg) p.o.

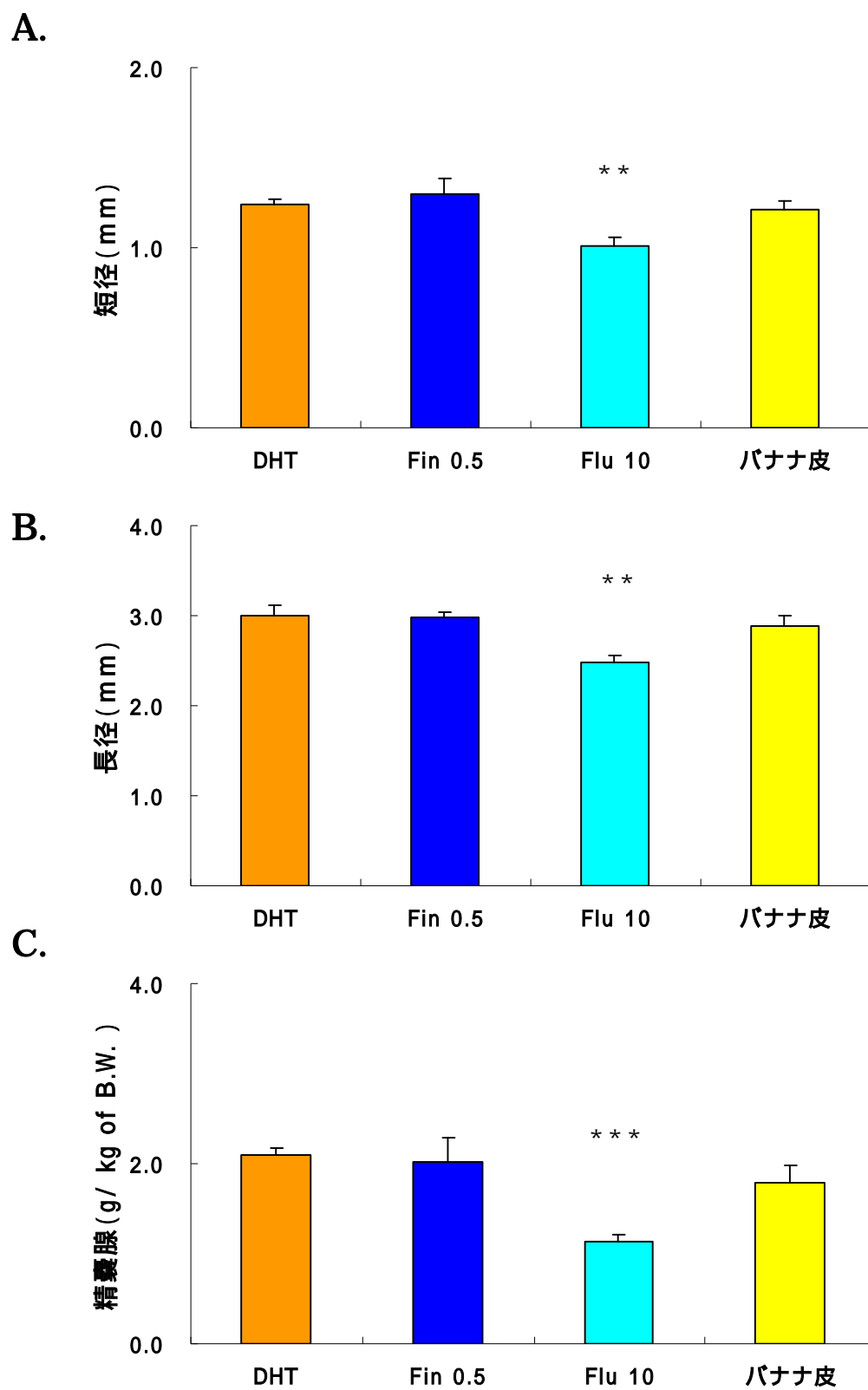


図 17 DHT 投与マウスの各臓器へのバナナ皮抽出物を与える影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (DHT)

### 3 - 6 ノコギリヤシ抽出物との比較試験

前立腺肥大抑制作用があるとして有名なノコギリヤシエキスとバナナ抽出物を用いて活性比較試験を行った。

バナナの皮抽出物投与群にバナナ皮抽出物 100 mg/kg (バナナ皮)、ノコギリヤシエキス投与群にバナナ皮抽出物 100 mg/kg (SP) を強制経口投与、Control 群 (TP)、バナナの皮抽出物投与群とコギリヤシエキス投与群は 2.0 mg/kg のプロピオン酸テストステロン (TP) 投与を行い、TP が、前立腺大きさおよび精嚢腺重量に影響することを確認するため、去勢手術のみの群を cas とした。

図 22 の活性試験の結果より、前立腺短径においてバナナ皮抽出物とノコギリヤシ果実抽出物に有意な前立腺大きさの減少が確認された。

#### 【図 22】

cas : 去勢のみ

TP : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p.

バナナ皮 : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + バナナ皮抽出物 (100 mg/kg) p.o.

SP : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + ノコギリヤシ果実抽出物(100 mg/kg) p.o.

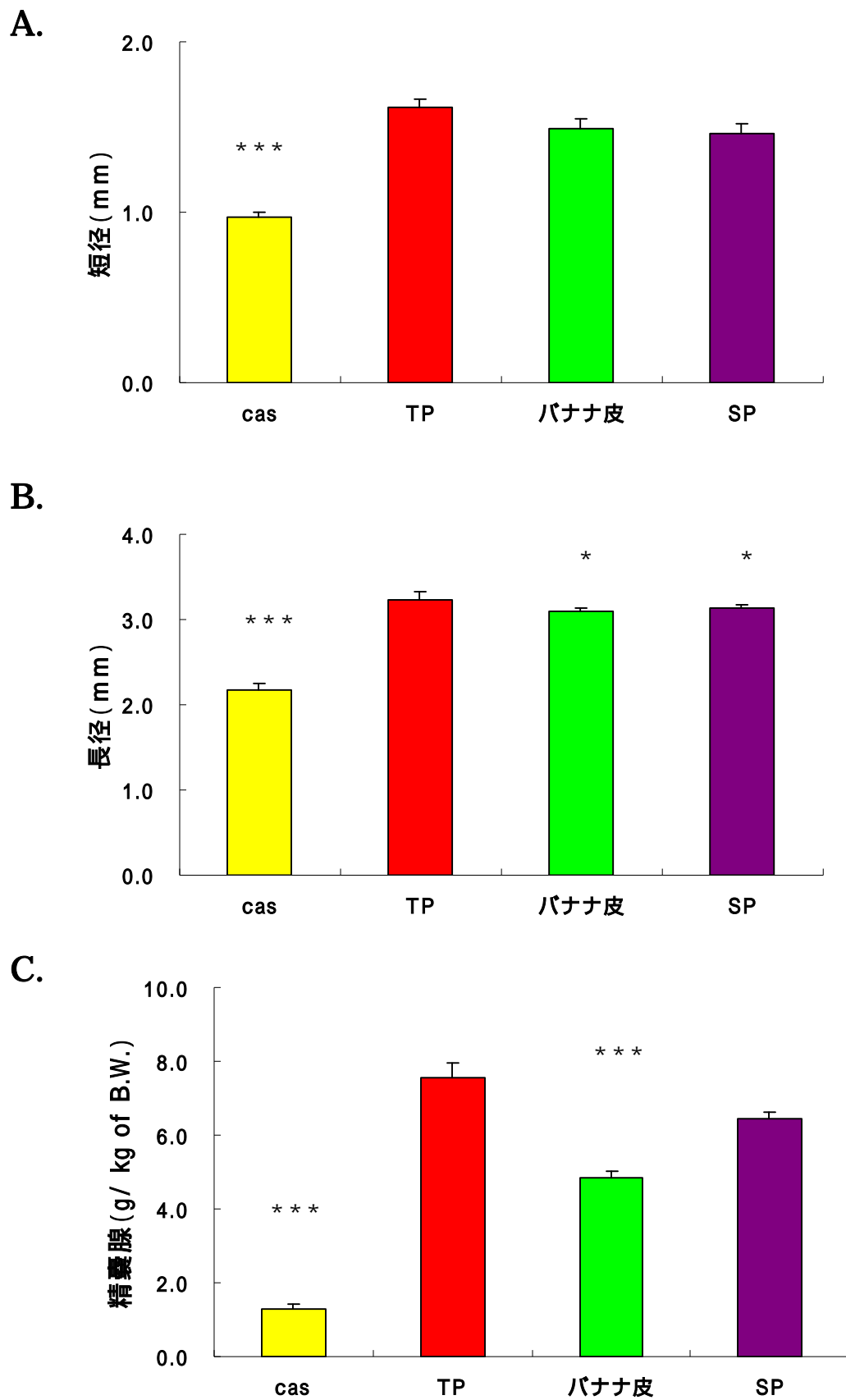


図 18 バナナ皮およびノコギリヤシ抽出物投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

### 3 - 7 バナナ皮の抽出法について

バナナの抽出処理の条件による活性の比較を行うために、バナナ皮の粗細物を1時間、3時間、5日間浸漬させたものと、バナナの皮を乾燥させてから1級メタノールにて抽出したものをサンプルとして試験を行った。

各投与群に100 mg/kgの1時間メタノール抽出(1H)、3時間メタノール抽出(3H)、5日間メタノール抽出(5D)、乾燥させたバナナの皮粉末(即日)、1日乾燥させたバナナの皮粉末(1日)を強制経口投与、全ての群に2.0 mg/kgのプロピオン酸テストステロン(TP)投与を行い、TPが、前立腺大きさおよび精嚢腺重量に影響することを確認するため、去勢手術のみの群をcasとした。

図23の活性試験の結果より、全てのバナナ各部位抽出物で有意な前立腺大きさの減少または減少傾向が確認された。

#### 【図23】

cas：去勢のみ

TP：去勢+TP(2.0 mg/kg) i.p.

1H：去勢+TP(2.0 mg/kg) i.p.+バナナ皮メタノール1時間浸漬抽出物(100 mg/kg) p.o.

3H：去勢+TP(2.0 mg/kg) i.p.+バナナ皮メタノール3時間浸漬抽出物(100 mg/kg)p.o.

5D：去勢+TP(2.0 mg/kg) i.p.+バナナ皮メタノール5日間浸漬抽出物(100 mg/kg)p.o.

1日：去勢+TP(2.0 mg/kg) i.p.+バナナ皮メタノール1日乾燥パウダー(100 mg/kg)p.o.

即日：去勢+TP(2.0 mg/kg) i.p.+バナナ皮メタノール乾燥パウダー(100 mg/kg)p.o.



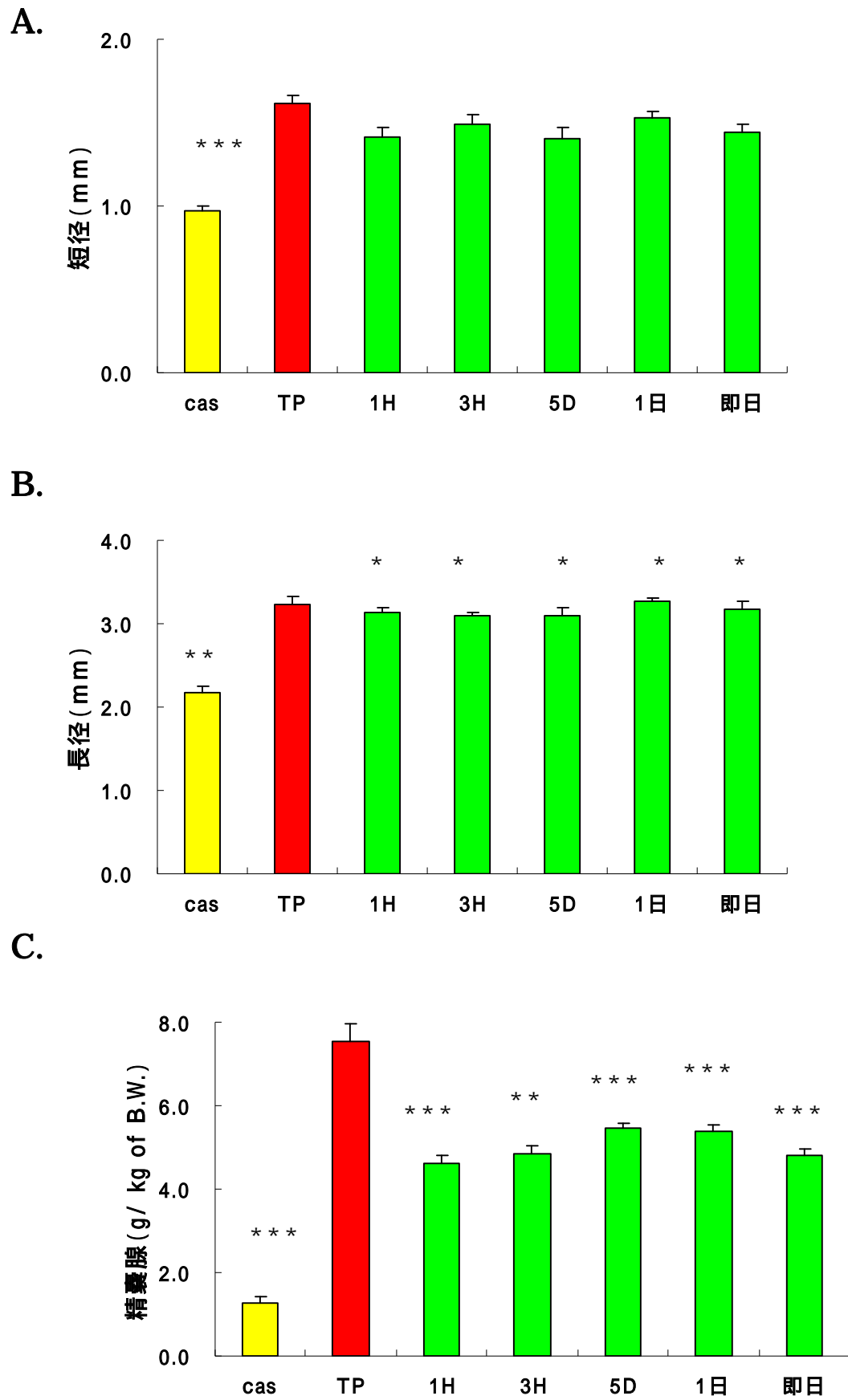


図 19 パナナ皮抽出法によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$  vs Control (TP)

### 3 - 8 cycloeucalione と植物ステロールの比較試験 (*in vivo*)

各投与群に 0.6  $\mu\text{mol/kg}$  の campesterol, stigmasterol, cycloeucalenone,  $\beta$ -sitosterol を強制経口投与、全ての群に 2.0 mg/kg のプロピオン酸テストステロン (TP) 投与を行った。campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol はタマ化学から購入した。

図 24 の活性試験の結果より、それぞれの植物ステロールで前立腺大きさの有意な減少または減少傾向が確認された。

#### 【図 24】

TP : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p.

cam : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + campesterol(0.6 $\mu\text{mol/kg}$ ) i.p.

stig : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + stigmasterol(0.6 $\mu\text{mol/kg}$ ) i.p.

cyclo : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + cycloeucalenone(0.6 $\mu\text{mol/kg}$ ) i.p.

$\beta$ -sito : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. +  $\beta$ -sitosterol(0.6 $\mu\text{mol/kg}$ ) i.p.

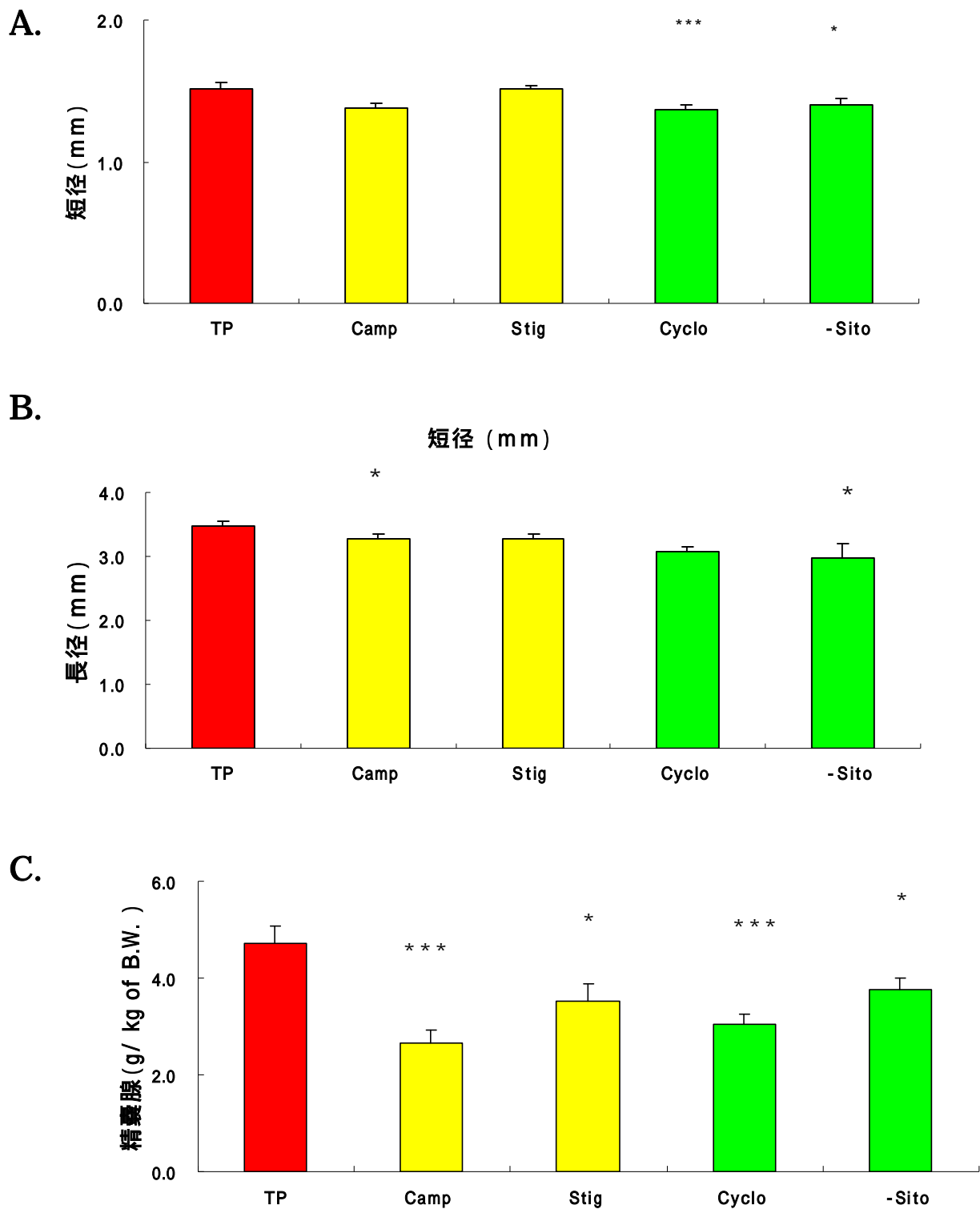


図 20 植物ステロール投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

### 3 - 9 バナナ各抽出物投与の活性試験

株式会社ヒロインターナショナルから入手した有機栽培バナナ（フィリピン産）の茎、葉、果軸、葉柄、果実、皮を流水でよく洗った後、切り刻み粗切物として10倍量の1級メタノールに3日間浸漬させてろ過を行いエバポレーターにて減圧乾固させたものをサンプルとして利用した。

100 mg/kgの葉抽出物（葉）、葉柄抽出物（葉柄）、果軸抽出物（果軸）、仮茎抽出物（仮茎）を強制経口投与、全ての群に2.0 mg/kgのプロピオン酸テストステロン（TP）投与を行った。また、フィリピン産バナナの根を輸入することができなかったので、バナナの本種であり観賞用として販売されているサンジャクバナナの各部位アルコール抽出物で試験を行った。100 mg/kgの葉抽出物（葉）、仮茎抽出物（茎）、根抽出物（根）を強制経口投与、全ての群に2.0 mg/kgのプロピオン酸テストステロン（TP）投与を行った。

図25の活性試験結果より、すべての群で有意な減少または減少傾向が確認された。図26の活性試験結果より、サンジャクバナナの葉と茎抽出物投与群で有意な減少が確認された。しかし、根には活性が確認されなかったことから、バナナ植物体の抗アンドロゲン作用は、果実を除く地上部位に存在すると示唆される。

#### 【図25】

TP：去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p.

葉：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + バナナ葉抽出物 (100 mg/kg) p.o.

葉柄：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + バナナ葉柄抽出物 (100 mg/kg) p.o.

果軸：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + バナナ果軸抽出物 (100 mg/kg) p.o.

仮茎：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + バナナ仮茎抽出物 (100 mg/kg) p.o.

#### 【図26】

cas：去勢のみ

TP：去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p.

葉：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + サンジャクバナナ葉抽出物(100 mg/kg) p.o.

茎：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + サンジャクバナナ茎抽出物 (100 mg/kg) p.o.

根：去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + サンジャクバナナ根抽出物 (100 mg/kg) p.o.

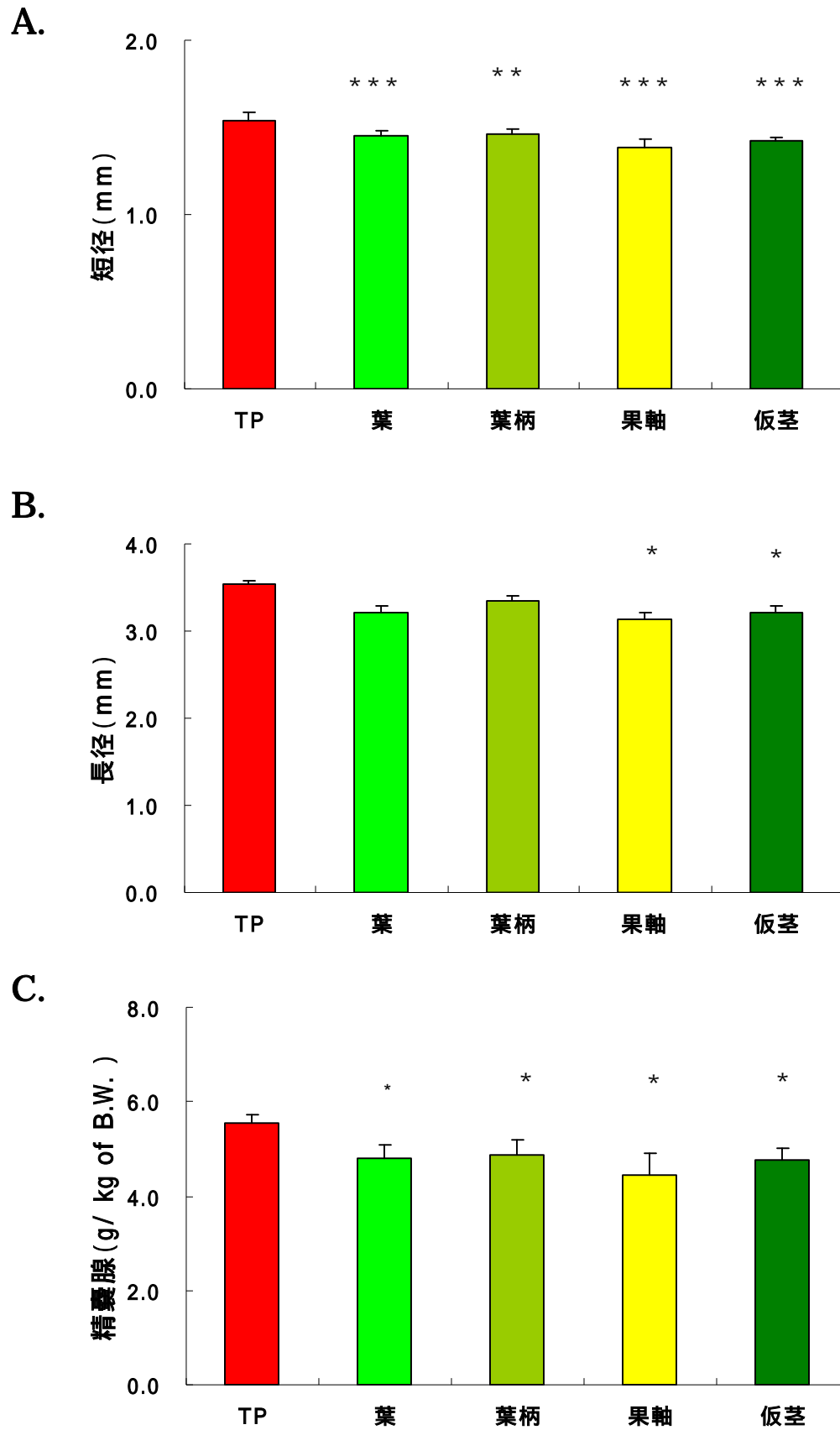
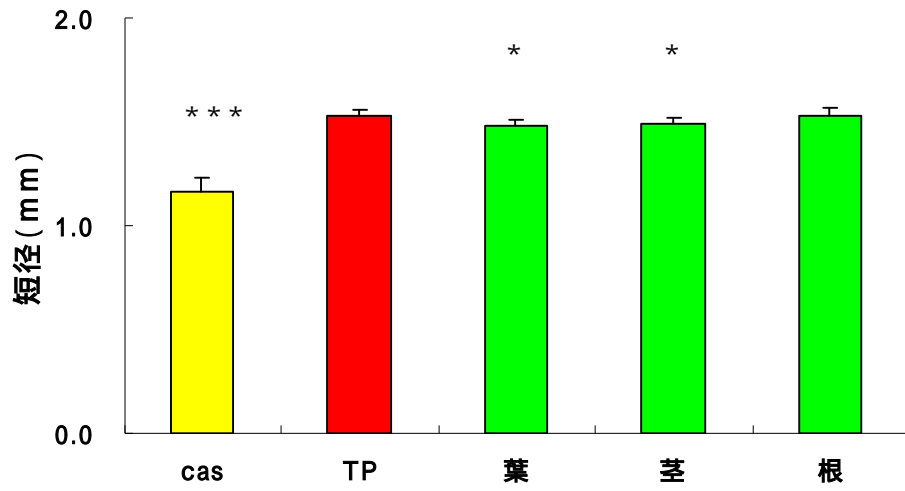


図 21 バナナの各部位抽出物投与によるマウス各臓器への影響

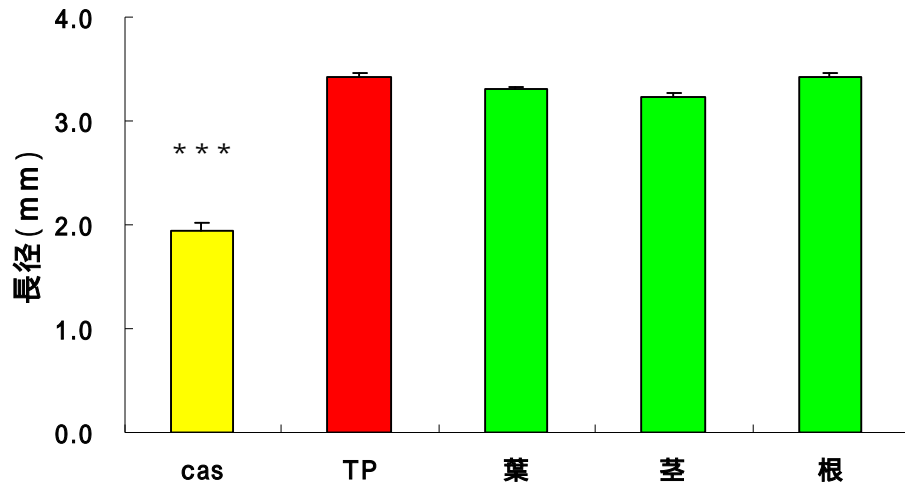
Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

A.



B.



C.

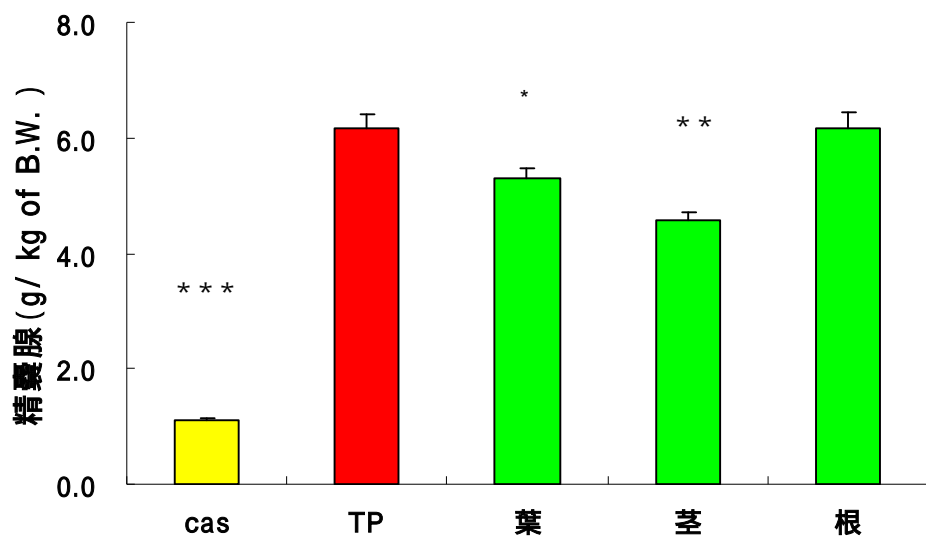


図 22 サンジャクバナナの各部位抽出物投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

*in vivo*でバナナ (*Musa spp.*) の皮抽出物で前立腺大きさと精嚢腺重量の有意な減少が確認された。更に *in vitro* でアンドロゲン依存性のあるヒト前立腺癌由来株化細胞 LNCaP でバナナの皮抽出物添加による細胞増殖抑制が確認されたことからバナナの皮抽出物に抗アンドロゲン作用があると考え、活性成分の単離・同定を行った結果、cycloeucalenone が見つかった。cycloeucalenone は植物ステロールの一種であり、有名な  $\beta$ -sitosterol、campesterol や stigmasterol と同等もしくは強い抗アンドロゲン活性をもつことがわかった。プロピオン酸テストステロンではなく DHT を投与した去勢マウスを用いた試験では前立腺大きさや精嚢腺重量の減少が見られなく Finasteride と同じ挙動を示したことから、現段階では cycloeucalenone は  $5\alpha$  リダクターゼ阻害活性などテストステロンが DHT に変換される前の段階に作用することがわかった。

また、バナナの皮は抽出条件や乾燥条件による大きい活性の変化は見られなかった。安全性試験 LD<sub>50</sub> は 5,000 mg/kg 以上であり、毒性はないと考えられる。バナナは皮だけでなく、果実を除く地上部位のアルコール抽出物で抗アンドロゲン作用も確認済みである。

本研究では、バナナ皮の活性成分についてのみ研究を進めたが、cycloeucalenone 以外の活性成分の有無、詳しいメカニズムの解明、実用化のためのヒト臨床試験などが今後の課題として残されている。他に、サンプルの季節による活性の差異があるかどうか、皮以外の部位の活性成分の構造決定やメカニズムの解明、他の機能性についての研究も必要であると考えられる。

バナナの果実は食品として流通しているが他の部位は廃棄物として破棄されている。本研究は、新規食品素材の発見だけでなく、未利用資源の新たな利用方法においても有益であると言える。

## 第4章 レモン (*Citrus limon*) 葉のアンドロゲン作用に関する研究

### 4 - 1 レモン (*Citrus limon*) とは

レモン (*Citrus limon*) はミカン科ミカン属の常緑低木で、果実にはビタミン C が多いことでよく知られている。主力品種はリスボンとユーレカがあり、特徴としてリスボンはトゲが比較的多く、ユーレカは少ない。

レモンの皮には *d*-リモネン (Limonene) というテルペン系炭化水素が含まれており、レモンの香りの重要な成分となっている。香料や天然物由来の溶剤として利用されている。また、葉も柔らかく広東料理の蛇スープでは定番の食材として使われている食経験のある食品素材である。葉についての成分の生理活性報告はほとんどない。



図 23 レモン (ユーレカ種) の葉



#### 4 - 2 レモン葉抽出物投与のマウスに及ぼす影響

##### 4 - 2 - 1 アルコール抽出物投与のマウスに及ぼす影響

食用レモンで有名なユーレカという品種レモンの葉を流水でよく洗った後、切り刻み粗切物として10倍量の1級メタノールに3日間浸漬させてろ過を行いエバポレーターにて減圧乾固させたものをサンプルとして利用した。

レモンの葉抽出物投与群にレモンの葉抽出物 10 mg/kg (lem 10), 100 mg/kg (lem 100), 500 mg/kg (lem 500) を強制経口投与、Control 群 (TP) とレモンの葉抽出物投与群は 2.0 mg/kg のプロピオン酸テストステロン (TP) 投与を行い、TP が、前立腺大きさおよび精嚢腺重量に影響することを確認するため、去勢手術のみの群を cas とした。

図 28 の活性試験の結果より、前立腺の大きさ長径と精嚢腺重量において有意な増加が確認された。

#### 【図 28】

TP : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p.

lem 10 : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + レモン葉抽出物 (10 mg/kg) p.o.

lem 100 : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + レモン葉抽出物 (100 mg/kg) p.o.

lem 500 : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + レモン葉抽出物 (500 mg/kg) p.o.

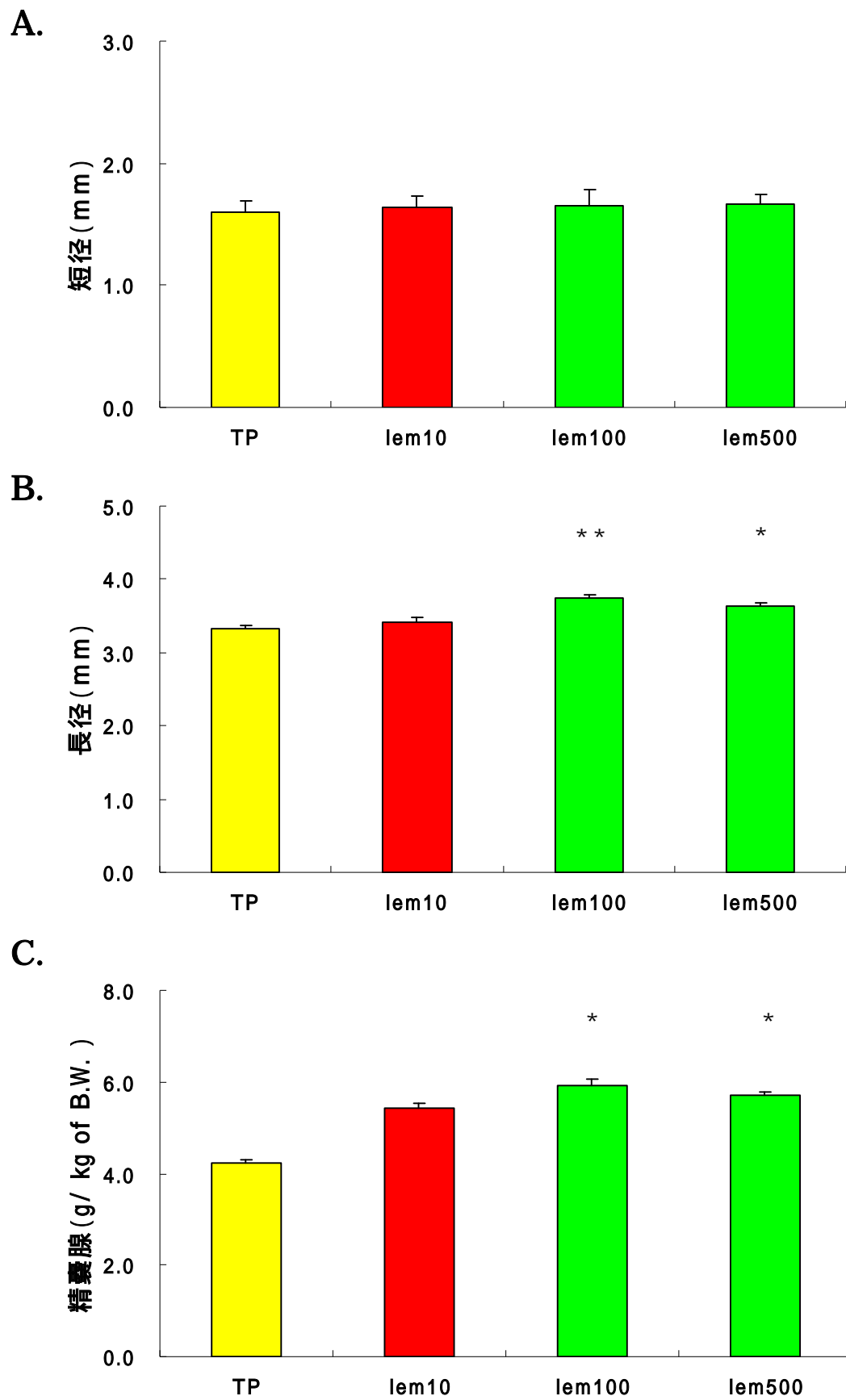


図 24 レモン葉アルコール抽出物投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  vs Control (TP)

#### 4 - 2 - 2 熱水抽出物投与のマウスに及ぼす影響

食用レモンで有名なユーレカという品種レモンの葉を流水でよく洗った後、切り刻み粗切物として熱水で抽出した後に、ろ過を行いエバポレーターにて減圧乾固させたものをサンプルとして利用した。

レモンの葉投与群に、100 mg/kg のレモンの葉メタノール抽出物 (LLM) ,レモンの葉熱水抽出物 (LLH) を強制経口投与した。Control 群はサンプルを投与しない去勢手術のみ群 (cas) とした。

図 29 の活性試験の結果より、レモン葉メタノール抽出物と熱水抽出物で有意な前立腺大きさと精嚢腺重量の増加が確認された。また TP を投与しないモデルマウスにおいてもレモン葉抽出物で前立腺の大きさと精嚢腺重量の増加作用があることがわかった。

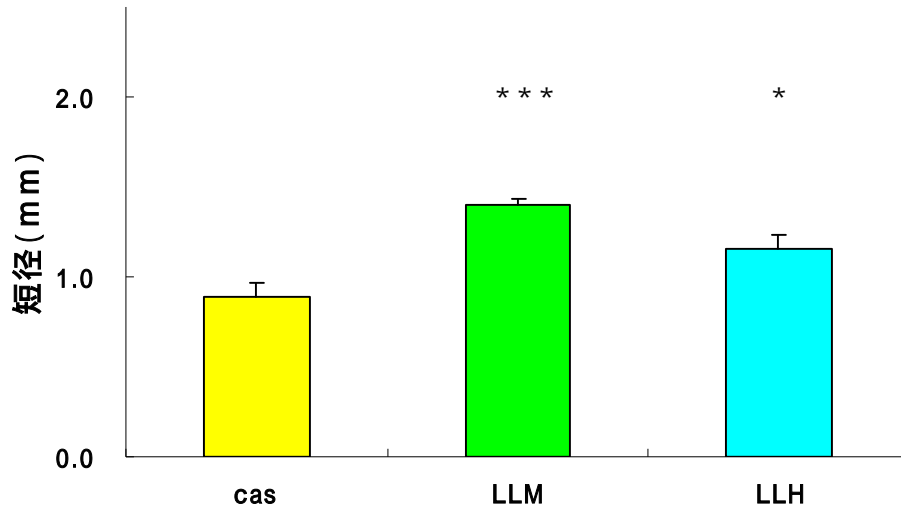
#### 【図 29】

cas : 去勢のみ

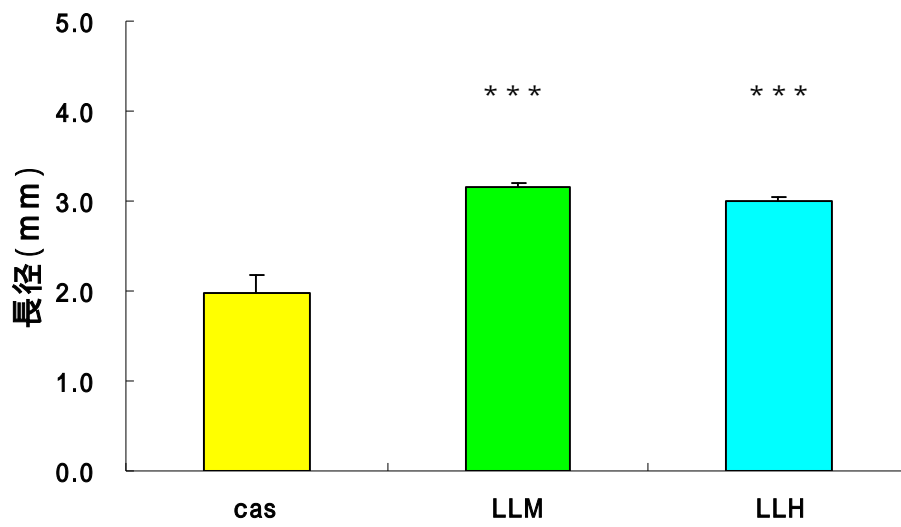
LLM : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + レモン葉メタノール抽出物 (100 mg/kg) p.o.

LLH : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + レモン葉熱水抽出物 (100 mg/kg) p.o.

A.



B.



C.

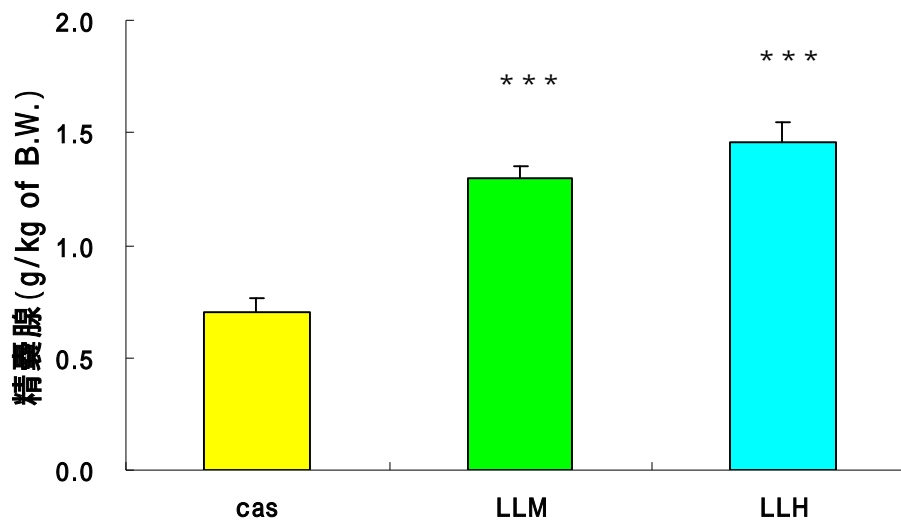


図 25 レモン葉熱水抽出物 (LLH) およびアルコール抽出物 (LLM) 投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (cas)

#### 4 - 2 - 3 品種間におけるレモン葉抽出物投与によるマウスに及ぼす影響の確認

スイートレモンとユーレカの 2 つの品種間の活性に差異があるかを確認するために試験を行った。

レモンの葉投与群に、100 mg/kg のスイートレモンの葉メタノール抽出物（スイート）、ユーレカレモンの葉メタノール抽出物（ユーレカ）を強制経口投与した。Control 群はサンプルを投与しない去勢手術のみ群（cas）とした。

図 30 の活性試験の結果より、スイートレモンとユーレカレモンの葉抽出物で有意な前立腺大きさと精嚢腺重量の増加が確認された。

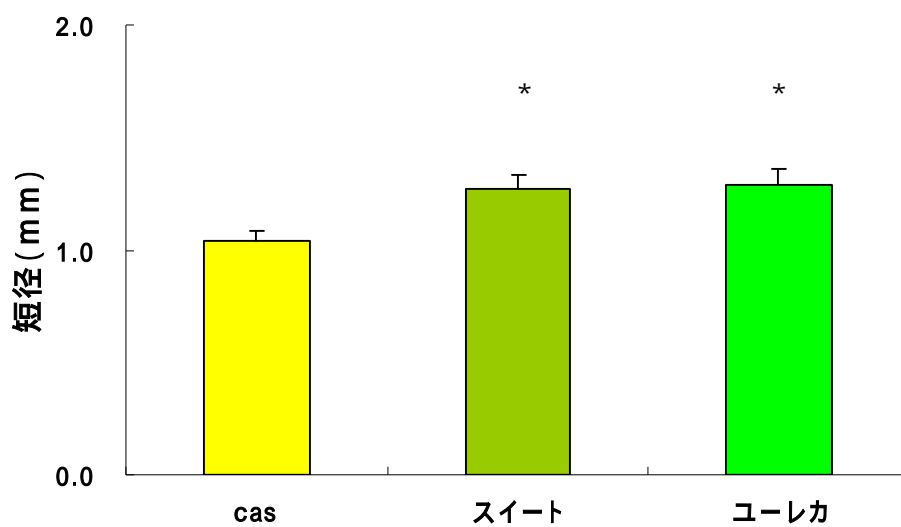
#### 【図 30】

cas：去勢のみ

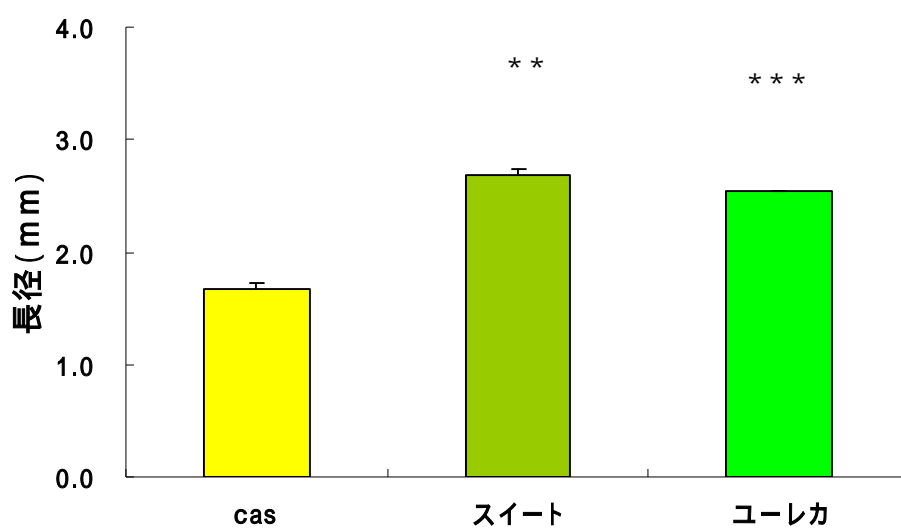
スイート：去勢 + スイートレモンの葉メタノール抽出物 (100 mg/kg) p.o.

ユーレカ：去勢 + ユーレカレモンの葉メタノール抽出物 (100 mg/kg) p.o.

A.



B.



C.

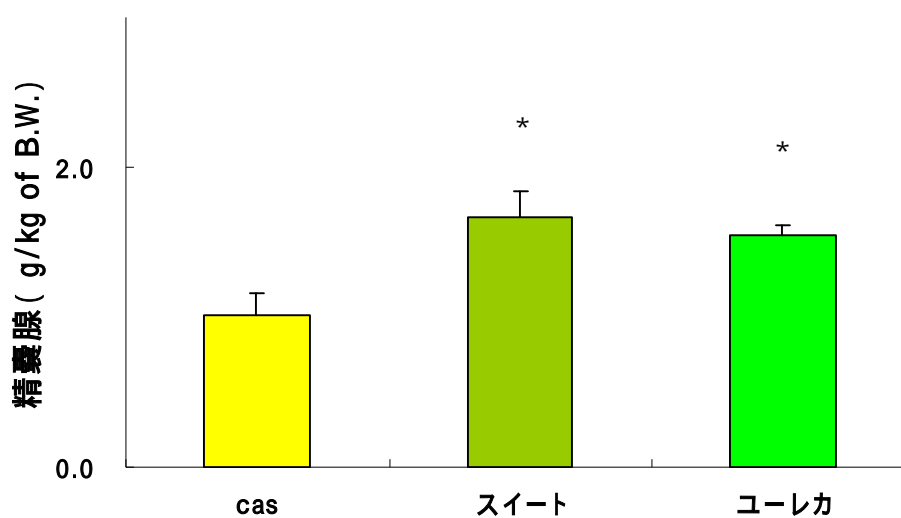


図 26 2 種類のレモン葉投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (cas)

#### 4 - 3 レモン葉抽出物投与の LNCaP 細胞増殖に及ぼす影響

レモンの葉アルコール抽出物を添加して LNCaP 細胞で細胞試験を行い、細胞増殖を観察した。図 31 の細胞試験の結果より、レモン葉抽出物に濃度依存的な増殖抑制作用が確認されたので、アンドロゲン様作用があると考えた。

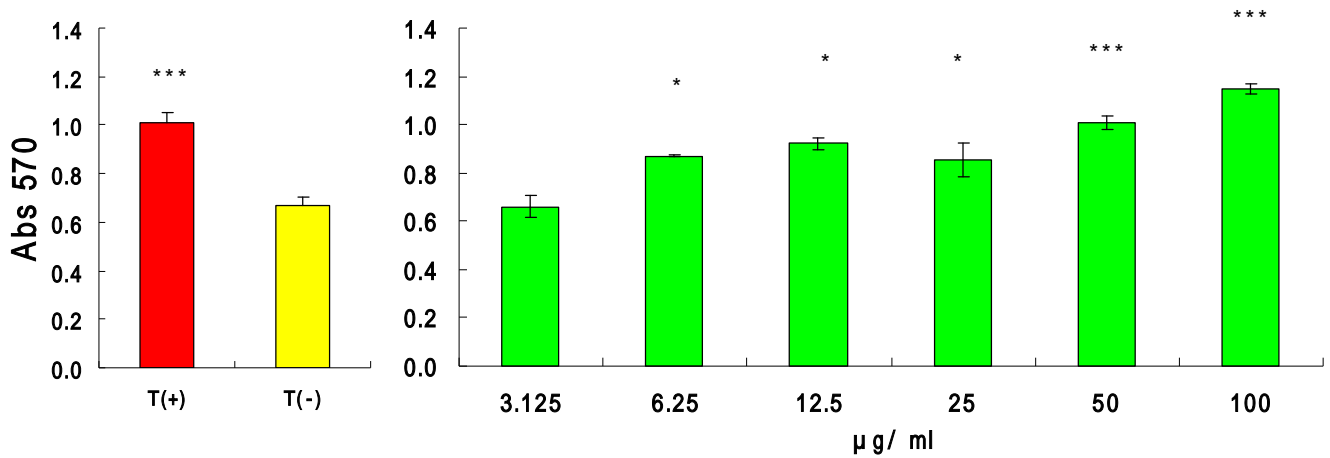


図 27 レモン葉アルコール抽出物添加における LNCaP 細胞増殖への影響 (n=3)

Each value represents mean ± S.E.

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs T(-)

#### 4 - 4 レモン葉のアンドロゲン様活性成分の単離および同定

レモンの葉抽出物を二液分配法により分画して、水、60%メタノール、ヘキサン、ジクロロメタンの4つに分けてエバポレーターで減圧乾固させた(図32)。

分画物投与群に100 mg/kgの、水画分(water)、60%メタノール画分(60%MeOH)、ヘキサン画分(Hex)、ジクロロメタン画分(ジクロロ)を強制経口投与、Control群(TP)と分画物投与群は2.0 mg/kgのプロピオン酸テストステロン(TP)投与を行った。

図33の活性試験の結果より、短径ではヘキサン画分、長径では水画分とヘキサン画分に有意な前立腺大きさの増加が確認された。精嚢腺重量では水画分とヘキサン画分に有意な増加が確認された。よって水画分とヘキサン画分に活性成分があると判断した。

活性が確認されたフラクション

括弧内の数字は収率を表す

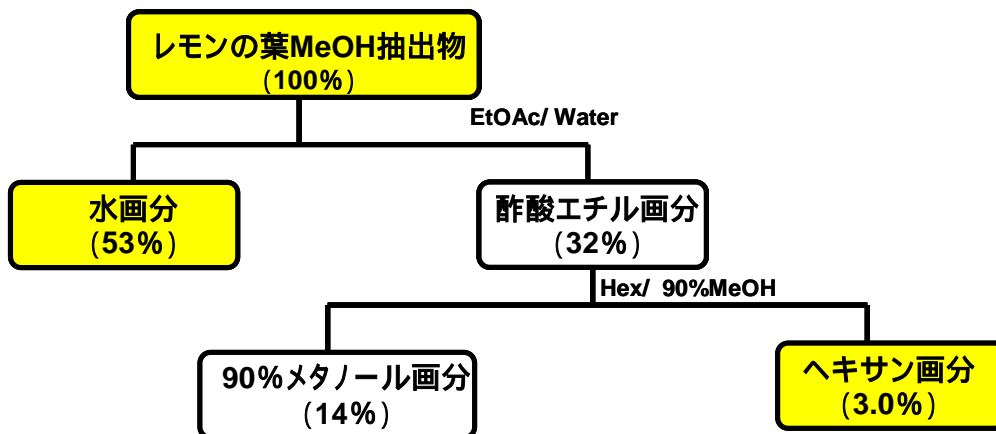


図 28 レモン葉抽出物の活性成分分画スキーム

#### 【図 33】

TP : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p.

water : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + 水画分(100 mg/kg) p.o.

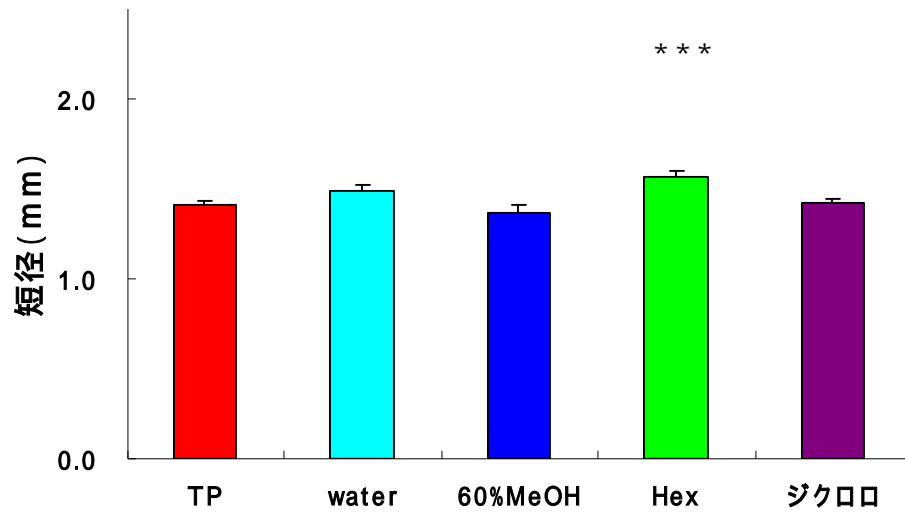
60Me : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + 60%メタノール画分 (100 mg/kg) p.o.

Hex : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + ヘキサン画分(100 mg/ kg) p.o.

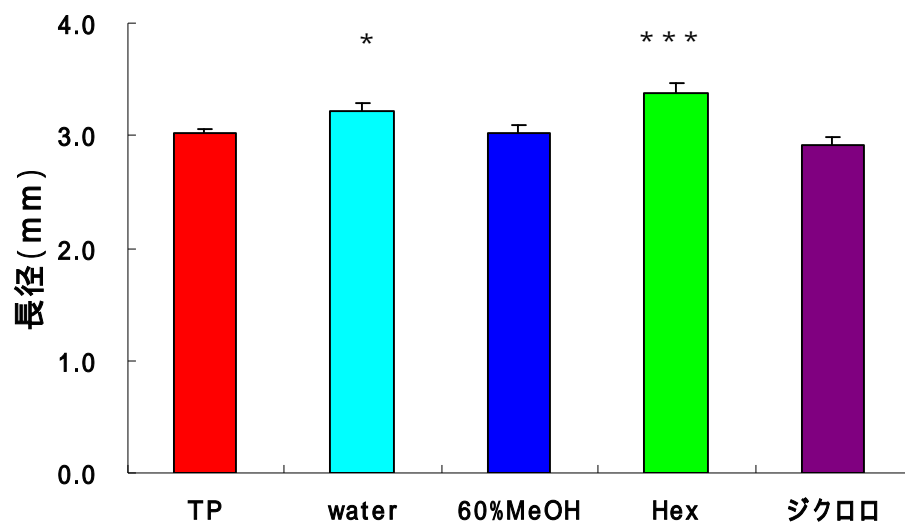
ジクロロ : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + ジクロロメタン画分(100 mg/kg) p.o.



A.



B.



C.

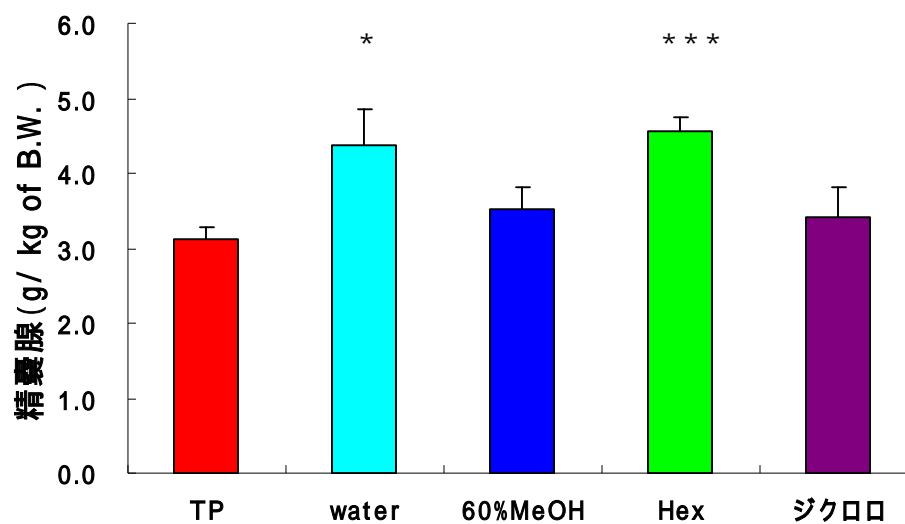


図 29 2液分配法で得られた分画物投与におけるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

レモンの葉抽出物を二液分配法により分画して得た水画分（水画分）を、さらにブタノールと水で 2 つに分けて、これらをエバポレーターで減圧乾固させてブタノール画分（BuOH 画分）と水画分（水画分）を得た（図 34）。

分画物投与群に 100 mg/kg レモンの葉メタノール抽出物 (LLM)、25 mg/kg BuOH 画分、76 mg/kg 水画分 を強制経口投与した。Control 群はサンプルを投与しない去勢手術のみ群 (cas) とした。

図 35 の活性試験の結果より、BuOH 画分に前立腺大きさの有意な増加がみられた。

活性が確認されたフラクション

括弧内の数字は収率を表す

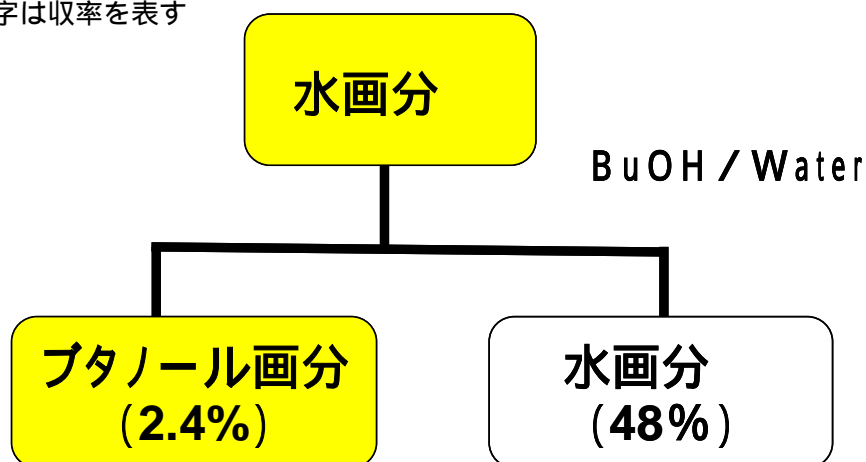


図 30 レモン葉の活性成分分画スキーム

**【図 35】**

cas : 去勢

LLM : 去勢 + レモン葉メタノール抽出物(100 mg/kg) p.o.

Water : 去勢 + 水画分 (76 mg/kg) p.o.

BuOH : 去勢 + ブタノール画分(25 mg/ kg) p.o.

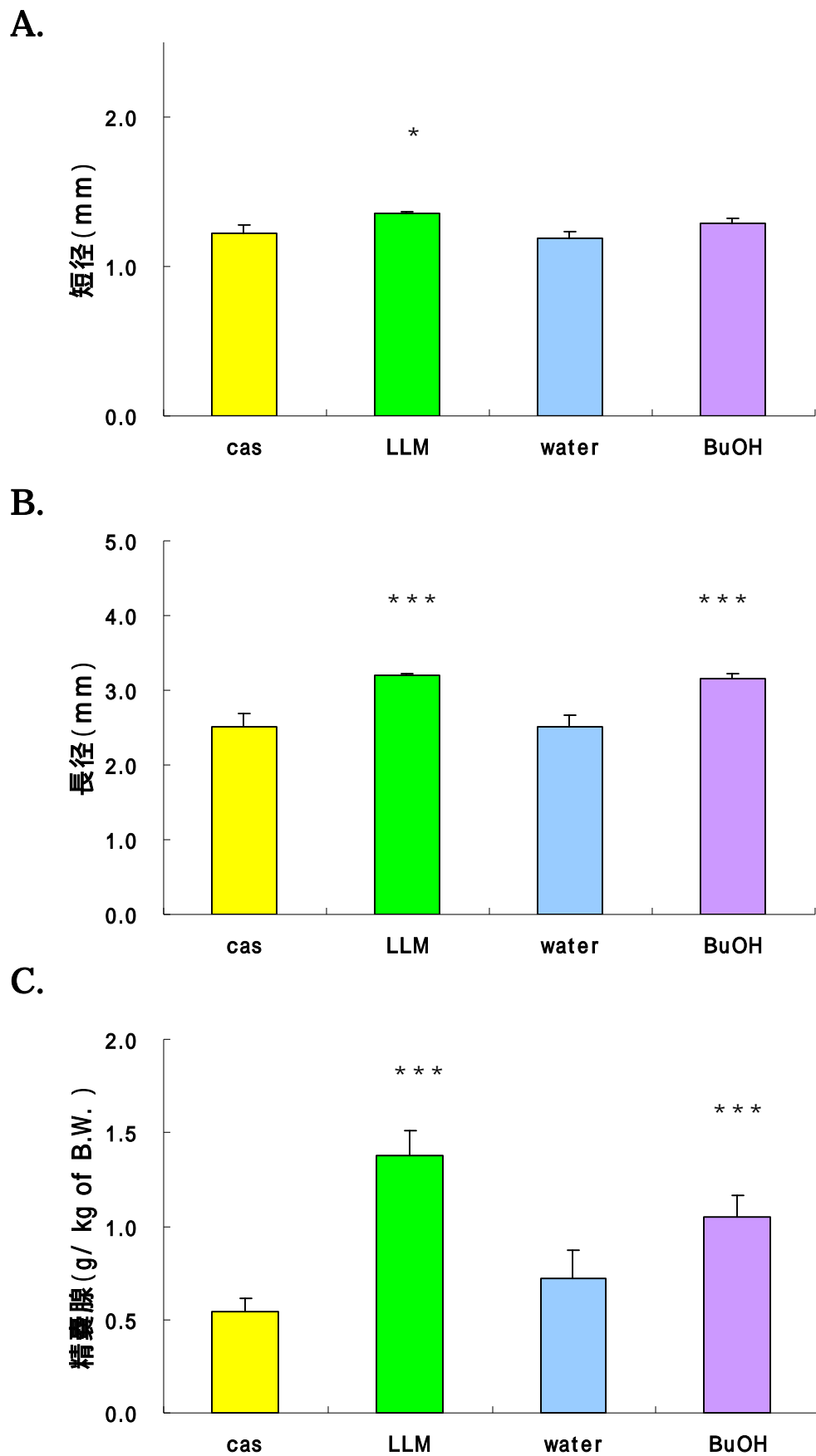


図 31 2液分配法で得られた分画物投与におけるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

#### 4 - 4 - 1 ヘキサン画分

ヘキサン画分をシリカゲルオープンカラムで Fr. 1 ~ Fr. 5 に分画した ( 図 36 )。Fr. 1 (9.4 mg/kg), Fr. 2 (24.6 mg/kg), Fr. 3 (11.8 mg/kg), Fr. 4 (80.6 mg/kg), Fr. 5 (73.6 mg/kg) を強制経口投与した。Control 群 ( TP ) と分画物投与群は 2.0 mg/kg のプロピオン酸テストステロン ( TP ) 投与を行った。

図 37 の活性試験の結果より、すべての画分で前立腺大きさの有意な増加がみられなかったが、Fr. 1 投与群で精囊腺重量に有意な増加が確認されたので、Fr. 1 を HPLC で分画した結果、図 38 に示すチャートが得られた。

活性が確認されたフラクション

括弧内の数字は収率を表す

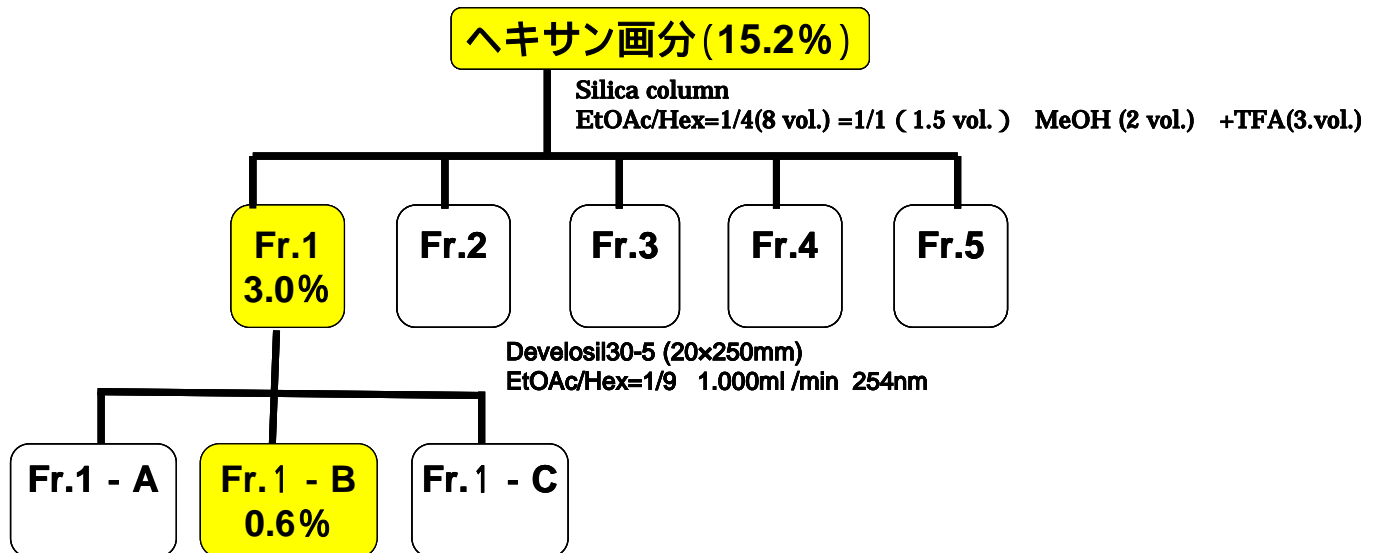


図 32 ヘキサン画分スキーム

#### 【図 37】

TP : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p.

Fr.1 : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + Fr.1 (9.4 mg/kg) p.o.

Fr.2 : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + Fr.2 (24.6 mg/kg) p.o.

Fr.3 : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + Fr.3 (11.8 mg/kg) p.o.

Fr.4 : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + Fr.4 (80.6 mg/kg) p.o.

Fr.5 : 去勢 + TP(2.0 mg/kg) i.p. + Fr.5 (73.6 mg/kg) p.o.

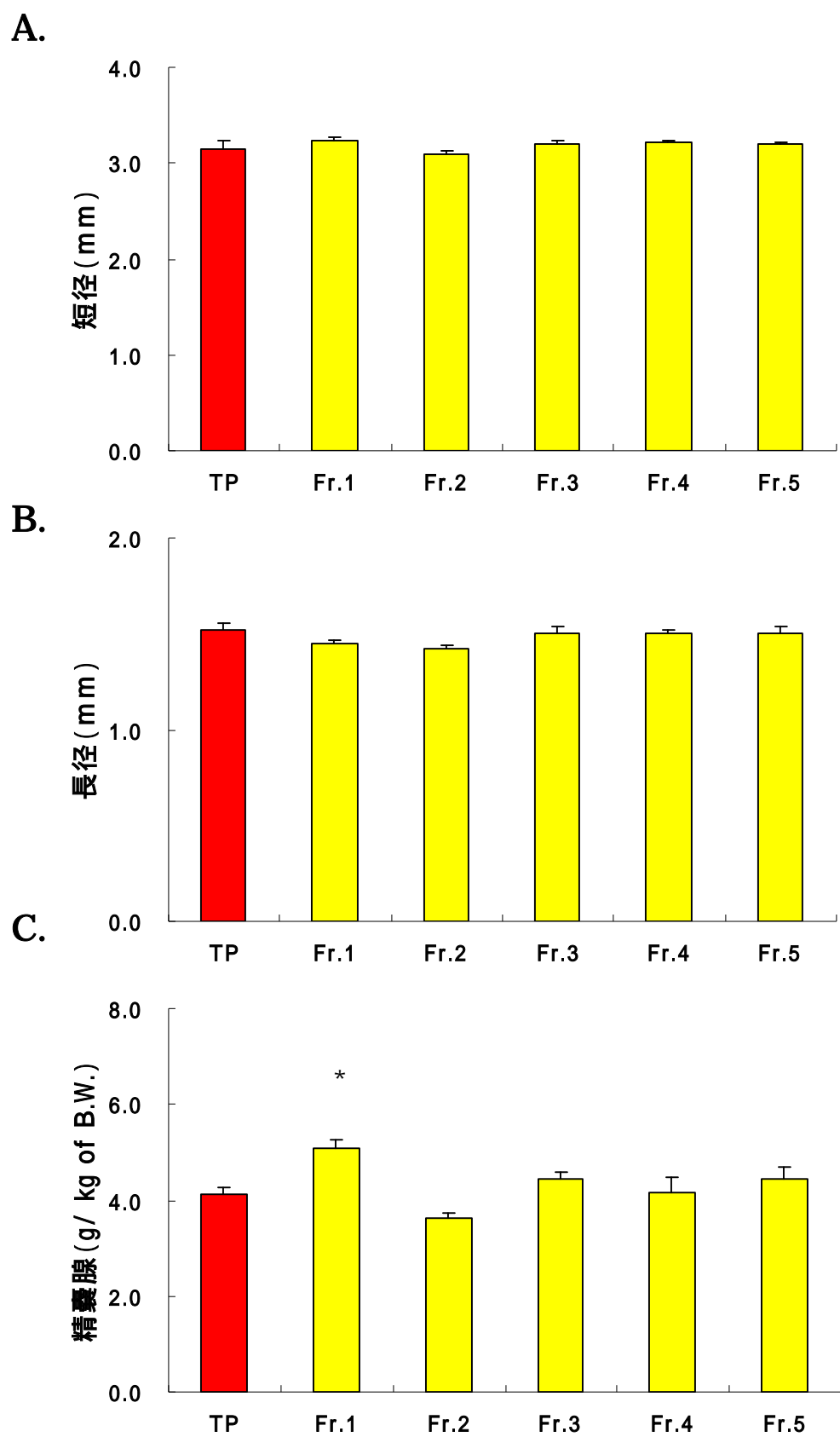


図 33 ヘキサン画分 Fr.1 ~ Fr.7 投与におけるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$  vs Control (TP)

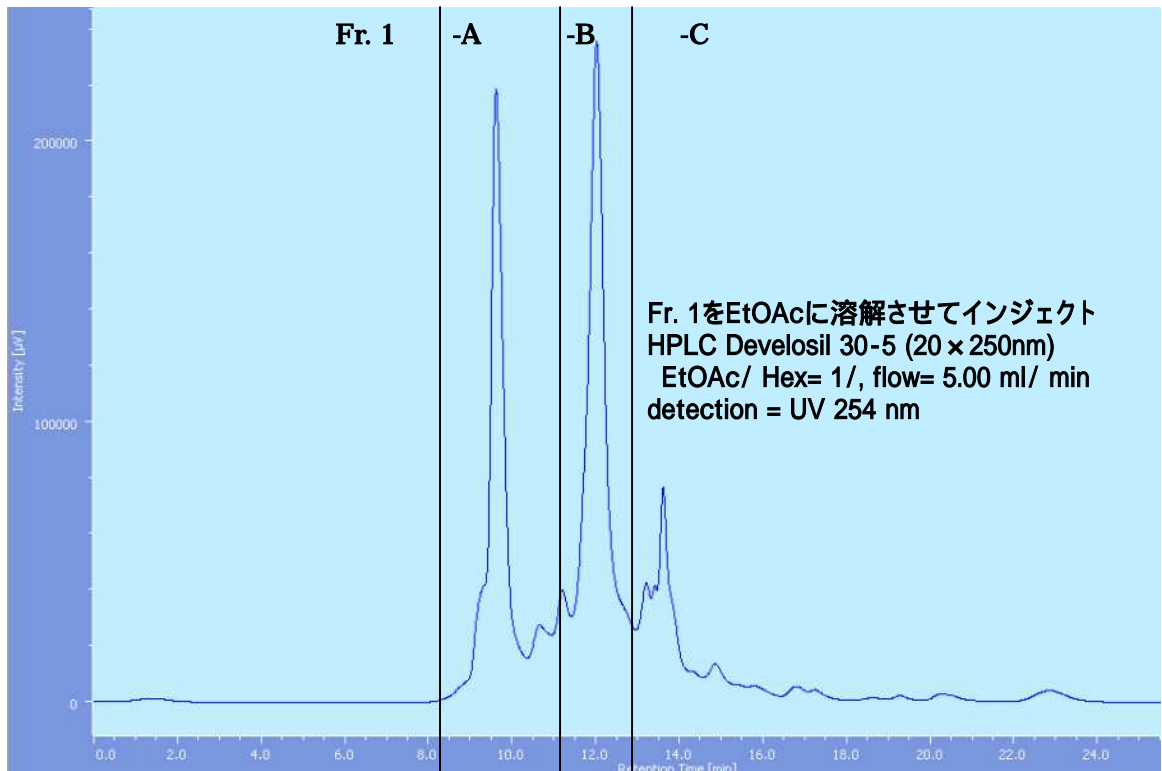


図 34 ヘキサン画分 Fr.1 の分画で得られた HPLC チャート

Fr. 1 を HPLC で分画して得た Fr. 1-A, 1-B, 1-C, 1-D (メタノール 100% カラムを洗浄時に得られたもの) を、Fr. 1-A (2.7 mg/kg), Fr. 1-B (1.4 mg/kg), Fr. 1-C (2.7 mg/kg), Fr. 1-D (1.4 mg/kg) を強制経口投与した。Control 群 (TP) と分画物投与群は 2.0 mg/kg のプロピオン酸テストステロン (TP) 投与を行った。

図 40 の活性試験の結果より、すべての画分で前立腺大きさの有意な増加がみられなかったが、Fr. 1-B 投与群で精嚢腺重量に有意な増加が確認されたので、Fr. 1-B が活性成分であると判断した。

**【図 39】**

TP : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p.

Fr. 1-A : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + Fr. 1-A (2.7 mg/kg) p.o.

Fr. 1-B : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + Fr. 1-B (1.4 mg/kg) p.o.

Fr. 1-C : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + Fr. 1-C (2.7 mg/kg) p.o.

Fr. 1-D : 去勢 + TP (2.0 mg/kg) i.p. + Fr. 1-D (1.4 mg/kg) p.o.

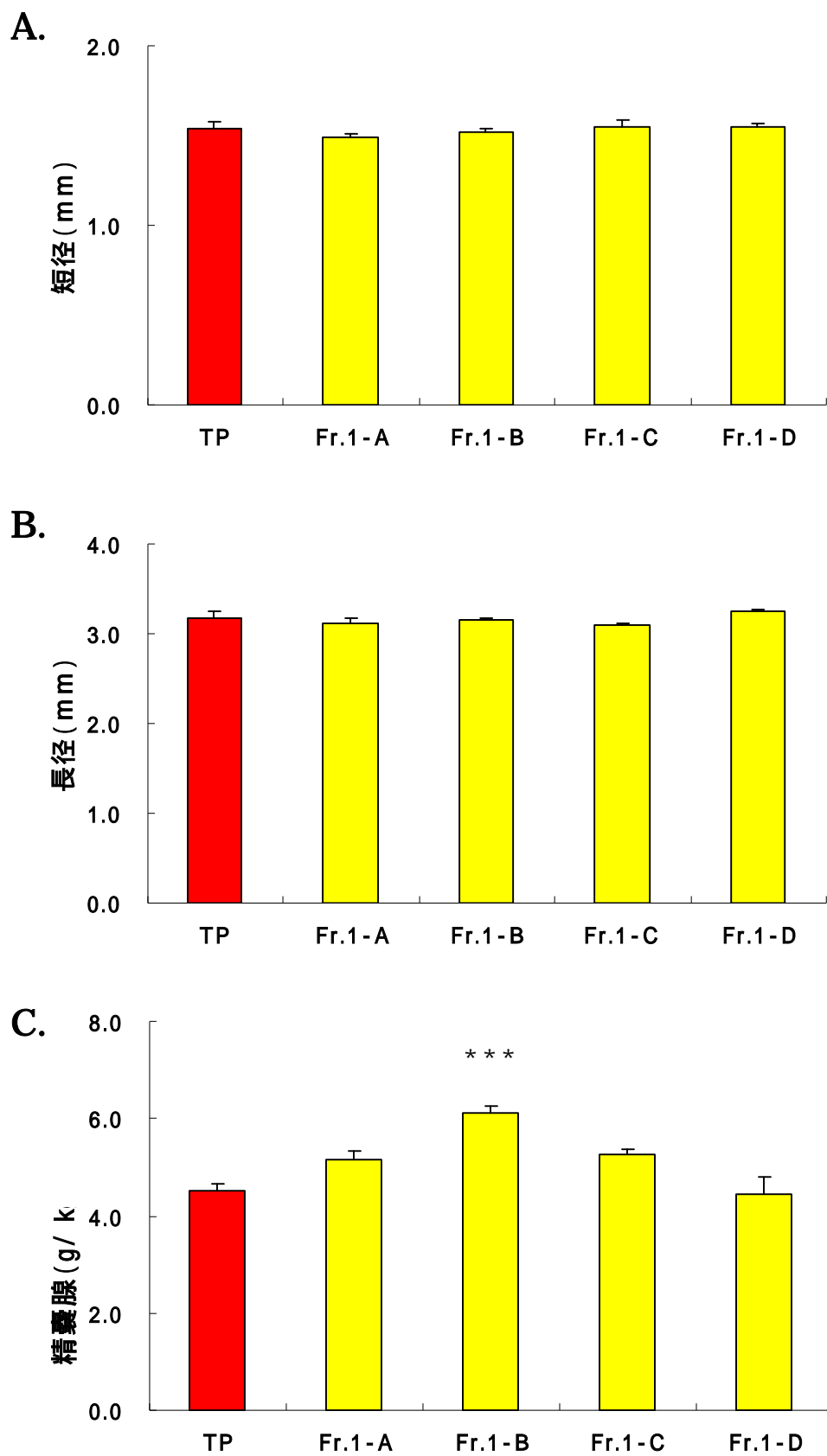


図 35 ヘキサン画分 Fr.1 - A ~ Fr.1 - C 投与におけるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (TP)

#### 4 - 4 - 2 ブタノールの分画

ブタノール画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで Fr. 1 ~ Fr. 6 に分画した ( 図 40 )

Fr. 1 (34 mg/kg), Fr. 2 (22 mg/kg), Fr. 3 ( 9.3 mg/kg ) , Fr. 4 (5.4 mg/kg), Fr. 5 (13 mg/kg), Fr. 6 (2.0 mg/kg)を強制経口投与した。Control 群はサンプルを投与しない去勢手術のみ群 ( cas ) とした。

図 41 の活性試験の結果より、短径では Fr.1, Fr. 2, Fr. 4, Fr. 5 に有意差があり、長径では Fr. 4 と Fr. 5 に有意差が確認された。精嚢腺重量では Fr. 3, Fr. 4, Fr. 5 に有意な増加が確認されたので、Fr. 4 と Fr. 5 に活性があると判断してこの 2 つを混ぜたものを Fr. 4 とした。

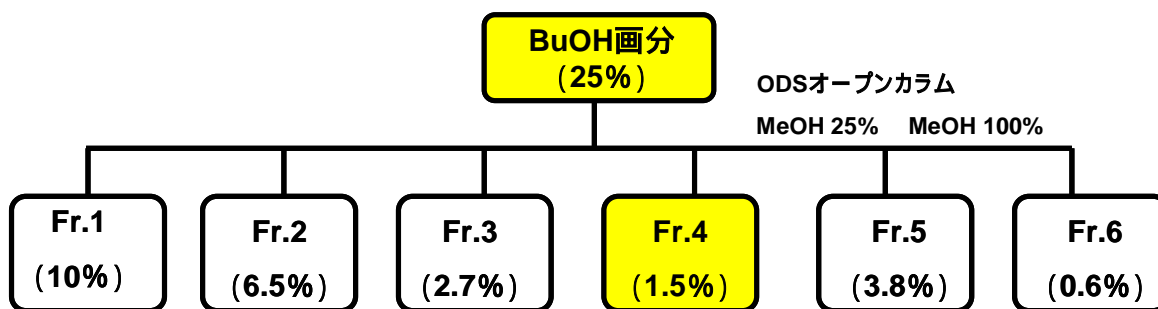


図 36 ブタノール画分スキーム

#### 【図 41】

cas : 去勢

Fr. 1 : 去勢 + Fr. 1 (34 mg/kg) p.o.

Fr. 2 : 去勢 + Fr. 2 (22 mg/kg) p.o.

Fr. 3 : 去勢 + Fr. 3 (9.3 mg/kg) p.o.

Fr. 4 : 去勢 + Fr. 4 (5.4 mg/kg) p.o.

Fr. 5 : 去勢 + Fr. 5 (13 mg/kg) p.o.

Fr. 6 : 去勢 + Fr. 6 (2.0 mg/kg) p.o.



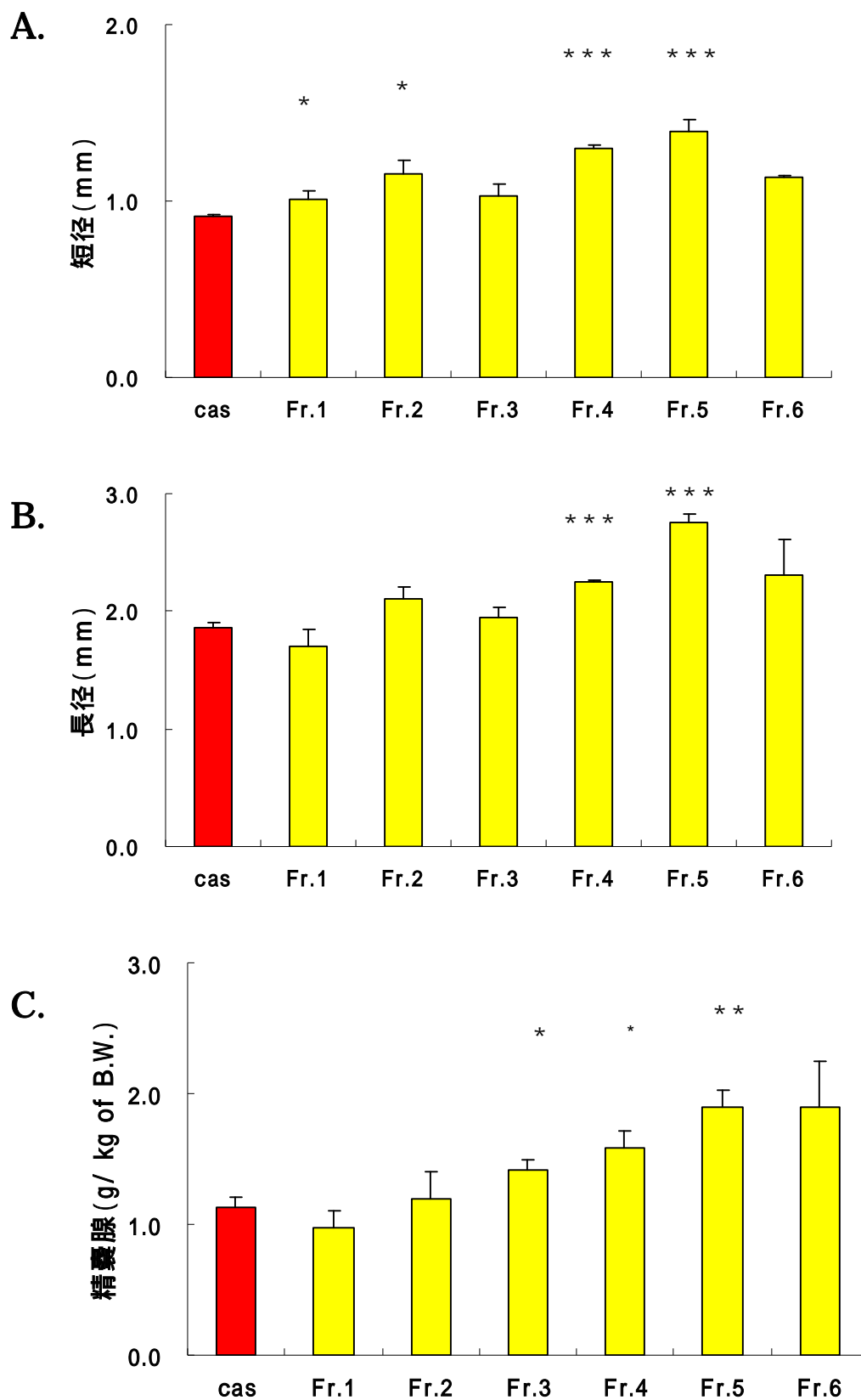


図 37 ブタノール分画物 Fr. 1 ~ Fr. 5 投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (cas)

Fr. 4 をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで Fr. 4-1 ~ Fr. 4-6 に分画した ( 図 42 )。 図 43 のような HPLC チャートが得られたので、Fr. 4-1 (34 mg/kg), Fr. 4-2 (22 mg/kg), Fr. 4-3 (9.3 mg/kg), Fr. 4-4 (5.4 mg/kg), Fr. 4-5 (13 mg/kg) を強制経口投与した。Control 群はサンプルを投与しない去勢手術のみ群 (cas) とした。Fr. 4-6 は少量だったので Fr. 4-5 に混ぜた。

図 44 の活性試験の結果より、短径では Fr. 4-3 に有意差があり、長径では Fr. 4-5 に有意差が確認された。精囊腺重量では Fr. 4-1 と Fr. 4-2 に有意な増加が確認された。精囊腺で活性が見られた Fr. 4-1 と Fr. 4-2 を混ぜて再び分画を行うことにした。

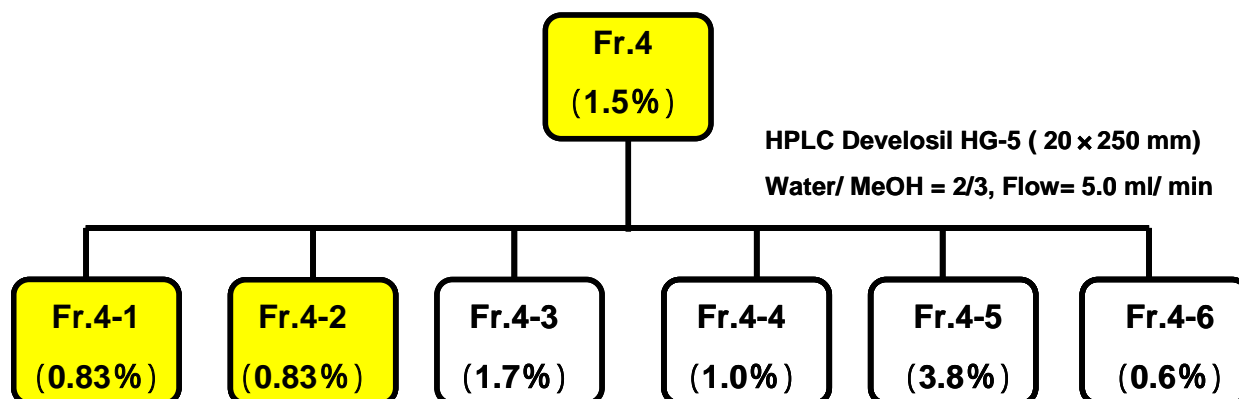


図 38 ブタノール分画スキーム

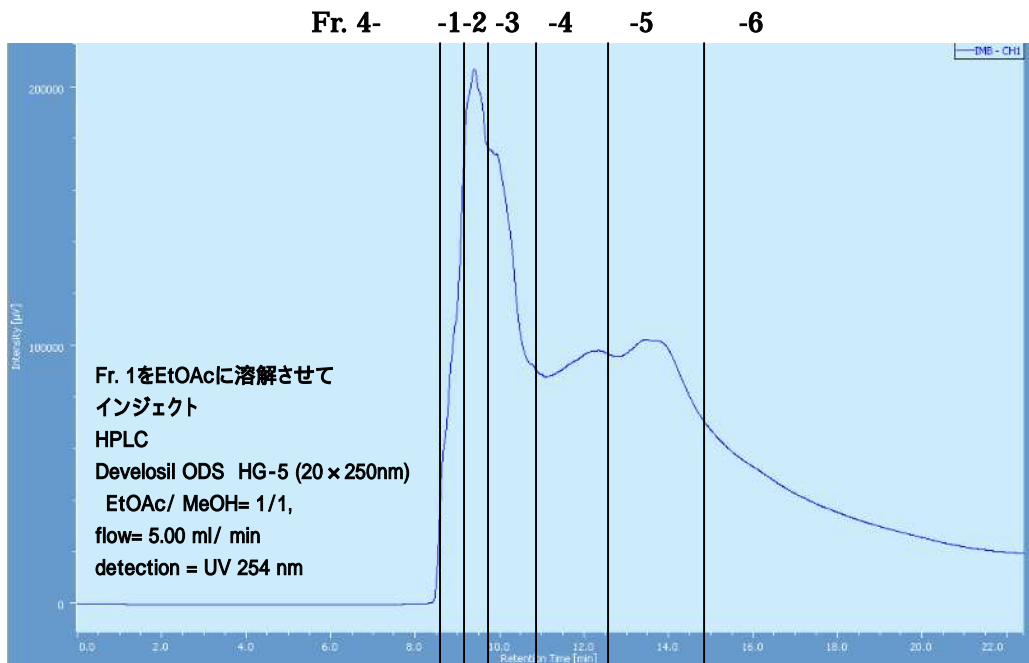


図 39 図 42 で得られた Fr.4 の分画 HPLC チャート

【図 44】

cas : 去勢

Fr. 4-1 : 去勢 + Fr.4-1 (1.6 mg/kg) p.o.

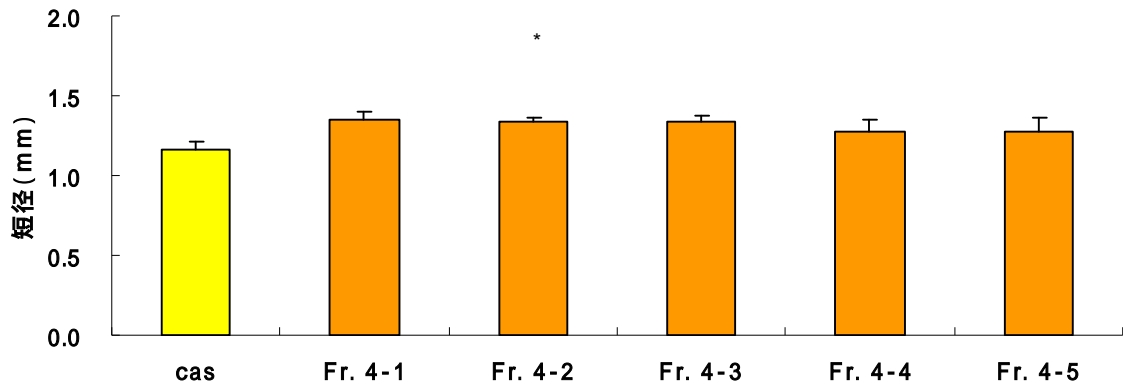
Fr. 4-2 : 去勢 + Fr.4-2 (1.6 mg/kg) p.o.

Fr. 4-3 : 去勢 + Fr.4-3 (3.6 mg/kg) p.o.

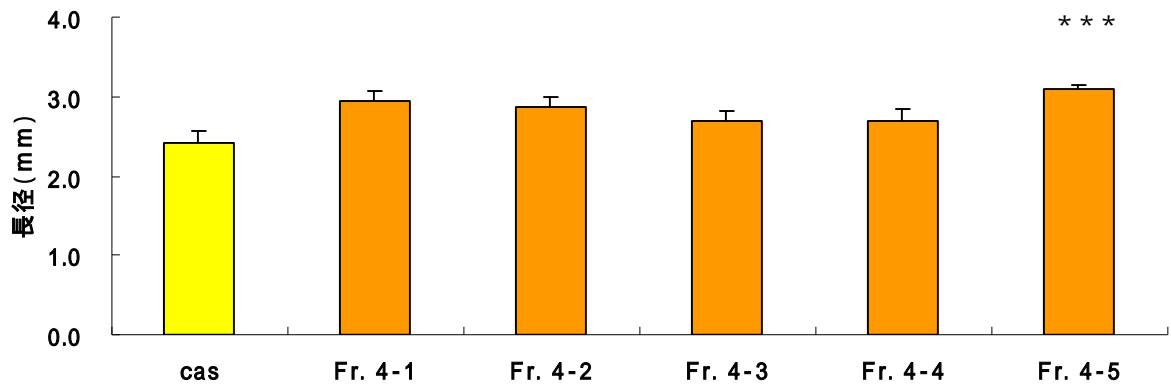
Fr. 4-4 : 去勢 + Fr.4-4 (2.0 mg/kg) p.o.

Fr. 4-5 : 去勢 + Fr.4-5 (8.0 mg/kg) p.o.

A.



B.



C.

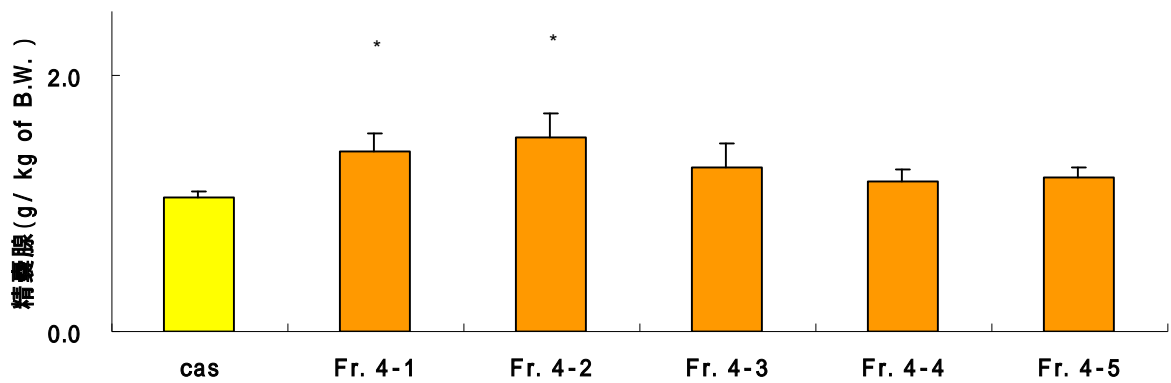


図 40 ブタノール分画物 Fr. 3-1~Fr. 3-5 投与によるマウス各臓器への影響

Each value represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.005$  vs Control (cas)

#### 4 - 5 考察

*in vivo*でレモン (*Citrus limon*) の葉抽出物で前立腺大きさと精嚢腺重量の有意な増加が確認された。更に *in vitro*でアンドロゲン依存性のあるヒト前立腺癌由来株化細胞 LNCaP でレモンの葉抽出物添加による細胞増殖促進が確認されたことからレモンの葉にアンドロゲン様作用があると考え、活性成分の単離を目的として分画を行った。ヘキサン画分とブタノール画分に活性が見られたので、活性成分は 2 つ以上存在し、脂溶性のものと水溶性のものがあることがわかった。TP 投与していないモデルマウスに関しても前立腺の大きさおよび精嚢腺重量の増加作用があったことから活性成分はアンドロゲン様作用があるステロイド構造をもつと考えられる。また、レモンの葉は熱水抽出物のアンドロゲン様作用も確認済みであり、熱水抽出物は香りもよく実用化しやすいと考えられる。食用レモンとして有名なユーレカ種、リスボン種、さらに品種改良されてできたスイートレモン種に活性が見られたので品種による差異はないのではないかと考えられる。

本研究は、レモンの葉にアンドロゲン様作用があることが確認できたところまでの研究であり、活性成分の有無、メカニズムの解明が今後の課題として残されている。

これまでアンドロゲン様作用をもつ食品素材の報告はほとんどない。レモンの葉は香辛料として使われていることから食経験もあり、将来において有用なヘルスフードの 1 つとして期待できる。

## 第5章 総括

現在の高齢社会において、男性更年期障害が注目されつつある。症状は大きく2つに分けることができる。1つは加齢に伴うフリーテストステロンの低下によって生じる筋肉・骨量の減少および性機能全般の低下であり、もう1つは特定細胞内の過剰なアンドロゲン作用に起因する前立腺肥大や脱毛症などである。療法としては相対するものになるが、いずれもアンドロゲンに関連するものであり、選択肢として抗アンドロゲン作用・アンドロゲン様作用を持つ食品素材がどちらとも必要である。

本研究では、食品素材による予防医学の観点から、アンドロゲン作動性のあるものを天然素材からスクリーニングした。その結果、いくつか有効なものを見出し、その中でも、抗アンドロゲン作用をもつ素材ではバナナ、アンドロゲン様作用をもつ素材ではレモンの葉に着目して研究を進めた。

バナナ植物体の果実を除く地上部位の各アルコール抽出物において *in vivo* および *in vitro* で抗アンドロゲン作用が確認された。その中でも、バナナの皮抽出物でさらに研究を進めた結果、バナナの皮は濃度依存的な抗アンドロゲン作用があり、その有効成分の1つに cycroecalenone があることが確認された。メカニズムとしては、DHTを使用した *in vivo* 試験で Finasteride と同じ挙動を示したことから、現段階では5 $\alpha$ -リダクターゼの阻害と考えられた。cycroecalenone と有名な植物ステロールである campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol と比較した結果、cycroecalenone は他の植物ステロールの中でも活性が強かった。また、前立腺肥大症の改善作用があることで有名なノコギリヤシ抽出物とバナナの皮抽出物を比較した結果、本研究の実験方法 (*in vivo*) ではバナナの皮の抗アンドロゲン作用が優れていた。

レモン葉のアルコール抽出物において *in vivo* および *in vitro* でアンドロゲン様作用が確認された。レモン葉は *in vivo* で熱水抽出物でも有意な活性が確認できた。また、品種間の差異がないことも確認した。分画を行った結果、2つ以上の活性成分が存在することがわかった。

現在、アンドロゲン作動性のある食品素材として並べられているのは、第1章で述べたノコギリヤシ、ペポカボチャ、マツの花粉、チョウセンニンジンなど種類が少なく、メカニズムや有効成分などが不明なものが多い。QOL向上のためには、選択肢を増やすことが重要である。本研究で見出したバナナの皮とレモン葉は食経験もあり、多くの更年期障害で悩む男性のために、食品による選択肢を増やす可能性のあるものだと考えられる。

男性ホルモンとして代表的なテストステロンは最終生産物ではなくアロマトラーゼ酵素により DHT やエストラジオールに変換される。最も強力なアンドロゲンである DHT と女性ホルモンの代表のエストラジオールは男性の健康や充足感に非常に影響を与える。最近の研究では加齢に伴い男性の体内で、エストラジオール増加が起こると共に SHBG 増加を引

き起こすという報告もある。以上より、今後はフリーテストステロン量やアンドロゲンとエストロゲンの割合のバランス変化も考慮して、男性更年期障害に有用なヘルスフードのさらなる研究が必要であると考える。

## 参考文献

- [ 1 ] John E. Morley, Androgens and aging. *Maturitas.*, **38**, 61-73 (2001).
- [ 2 ] Men Aging and Health: achieving health across the life span.
- [ 3 ] T.B. Hargreave, E.J.H. Meuleman, W. Weidner, Hormonal Replacement Therapy for Aging Men The Debate Goes On., *European Urology* **46**, 155-161 (2004).
- [ 4 ] 奥山明彦編, 男性更年期障害 LOH 症候群. 南山堂(2007).
- [ 5 ] 天野俊康, 男性更年期を治す. 講談社(2005).
- [ 6 ] 伊藤直樹, 塚本泰司, 男性更年期の概念. 医学のあゆみ 205, 380-384 (2003).
- [ 7 ] 辻村晃, 松宮清美, 奥山明彦, 古賀実, Bioavailable Testosterone と加齢・性機能. 日本生殖内分泌学会雑誌 9, 19-23 (2004).
- [ 8 ] 日本比較内分泌学会編. ホルモンハンドブック. 南江堂(1988).
- [ 9 ] H. Inano, et al., *Endocrinology*, **92**, 22-30 (1973).
- [ 10 ] Ashby, P. A. Lefevre, H. Yinwell, J. Odum, W Owens, Testosterone-stimulated weanlings as an alternative to castrated male rats in the Hurshberger anti-androgen assay., *Regulatory Toxicology and Pharmacology.*, **39**, 229-238 (2004).
- [ 11 ] 日本 Endourology・ESWL 学会作成. BPH(前立腺肥大症)診療ガイドライン(2001).
- [ 12 ] S. ハロッド・ビューナー著, 飯嶋慶子訳, The NATURAL TESTOSTERONE PLAN for Sexual Health and Energy. フレグランスジャーナル社(2009).
- [ 13 ] 矢澤一良編, ヘルスフード科学概論, 成山堂(2003).
- [ 14 ] 幸井俊高, 男のための漢方, 文藝春秋(2005).
- [ 15 ] Nadeem Talpur, Bobby Echard, Debasis Bagchi, Manashi Bagchi, Harry G. Preuss., Comparison of Saw Palmetto (extract and whole berry) and Cernitin on prostate growth in rats., *Molecular and Cellular Biochemistry.*, **250**, 21-26 (2003).
- [ 16 ] Bedner M, Michele M, Schantz, Lane C, Katherine E. Sharpless, Development of liquid chromatographic methods for the determination of phytosterols in Standard Reference Materials containing saw palmetto., *Chromatography A*, **1192**, 74-80 (2008).
- [ 17 ] Masayuki ABE, Yoshihiko ITO, Luvsantorj OYUNZUL, Tomomi OKI-FUJINO, Shizuo YAMADA, Pharmacologically Relevant Receptor Binding Characteristics and 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitory Activity of Free Fatty Acids Contained in Saw Palmetto Extract., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**(4), 646-650(2009)



- [ 1 8 ] Berry S. J., Coffey D.S., Walsh P.C., The development of human benign prostatic hyperplasia with age., *J. Urol.* **132**, 474-479 (1984).
- [ 1 9 ] Hurshberger L. G., Shipley E.G., Meyer R.K., Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method., *P. S. E. B. M.*, **83**, 175-180 (1953).
- [ 2 0 ] Chung Lee, Debra M, Sutkowski, Julia A. Sensibar, David Zelner, Regulation of Proliferation and Production of Prostate-Specific Antigen in Androgen-Sensitive Prostatic Cancer Cells LNCaP, by Dihydrotestosterone., *Endocrinology.*, **136**(2), 796-803(1995).
- [ 2 1 ] 日本比較内分泌学会編. ホルモン実験ハンドブック 2. 各種溶液と顕微標本. 学会出版センター(1991).
- [ 2 2 ] 日本比較内分泌学会編. ホルモン実験ハンドブック 1 飼育と手技. 学会出版センター ( 1991 ) .
- [ 2 3 ] Kanji Yamasaki, Masakuni Sawaki, Mineo Takatsuki, Strain sensitivity differences in the Hershberger assay., *Reproductive Toxicology.*, **15**, 437-440(2001).
- [ 2 4 ] 赤嶺基一郎. ホルモン作動性を有する新規食品素材の探索. 東京海洋大学修士学位論文(2007).
- [ 2 5 ] 福住仁, 池田孝則, 成田裕久, 男性における男性型脱毛症用薬 5 $\alpha$ -還元酵素 型阻害薬 Finasteride ( プロペシア錠 0.2 mg・1.0 mg ) の薬理学特性と臨床効果. *Folia Pharmacol. Jpn.*, **127**, 495-502 (2006).
- [ 2 6 ] C.B. Lazier, L.N. Thomas, R.C. Douglas, J.P Vessey, R.S. Rittmaster, Dutasteride, the Dual 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitor, Inhibits Androgen Action and Promotes Cell Death in the LNCaP Prostate Cancer Cell Line., *The Prostate.*, **58**, 130-144 (2004).
- [ 2 7 ] Jan Bouchal, Zdenek Kolar, Jana Madarova, Alice Hlobilkova, Erwin von Angerer, The effects of natural ligands of hormone receptors and their antagonists on telomerase activity in the androgen sensitive prostatic cancer Cell line LNCaP., *Biochemical Pharmacology.*, **63**, 1177-1171 (2002).
- [ 2 8 ] R. Hamid, Y. Rotshteyn, L. Rabadi, R. Parikh, P. Bullock, Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening., *Toxicology in vitro.*, **18**(5), 703-710 (2004).
- [ 2 9 ] LUCIA OLIVEIRA, CARMEN S.R. FREIRA, ARMANDO J. D. SILVESTRE, Lipophilic Extract from Banana Fruit Residues: A Source of Valuable Phytosterols., *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 9520-9524 (2008).

## 謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導を頂きましたヘルスフード科学（中島董一郎記念）寄附講座の矢澤一良客員教授、ならびに小山智之客員准教授に深く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり、多大なるご指導を頂きました食品栄養機能学講座の大島敏明先生に深く感謝の意を表します。

ヘルスフード科学講座運営にあたり多大なるご支援とご協力を頂きました株式会社中島董商店及びにキューピー株式会社に深く感謝の意を表します。

本研究を行いにあたり、有機栽培バナナを提供して頂きました株式会社ヒロインターナショナルに深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、多大なるご配慮を頂きました湘南医科学研究所の三瓶英子主任研究員、大塚伊津子主任研究員、輿石君子氏に厚く御礼を申し上げます。

最後に、研究室の皆様に感謝致します。

日本だけではなく、世界の各国で急速に進行しつつある高齢化社会を迎えて、QOL (Quality of life) 向上が重要な課題となっている。その1つとして、近年注目されている男性更年期障害がある。男性更年期障害は「加齢に伴う臨床的・生化学的症候群であり、特有の症状と血中テストステロン低下に特徴づけられる」と定義されており、LOH (late-onset hypogonadism) 症候群と呼ばれている。

LOH 症候群で有名な症状として前立腺肥大による排尿障害、脱毛、ED、無気力などがあり、症状に合わせて、抗アンドロゲン薬またはアンドロゲン作用薬を使わなければいけない。LOH 症候群の医薬品療法には抗アンドロゲン剤、合成アンドロゲン剤などが使用されているが、これらには副作用も多く報告される。また、医薬品よりも副作用が少ないと考えられる機能性食品素材もノコギリヤシ、ペポカボチャ、マカ以外でほとんど知られていない。

去勢したマウスに毎日一定量のテストステロンを投与することで男性更年期モデルマウスを作成し、各種天然素材抽出物から抗アンドロゲン作用およびアンドロゲン作用を有するものをスクリーニングした。テストステロン依存的に肥大する前立腺と精嚢腺を指標として、重量・大きさが減少したものは抗アンドロゲン作用、増加したものはアンドロゲン作用を有する可能性があるとして評価した後、アンドロゲン依存的に増殖するヒト前立腺癌由来株化細胞 LNCaP 細胞で試験を行い、増殖抑制または増殖促進作用を観察することで抗アンドロゲン作用、アンドロゲン作用があることを確認した。

バナナの皮抽出物に抗アンドロゲン作用、レモンの葉にアンドロゲン作用を発見した。それぞれの活性成分をオープンカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどを用いて単離し、各種スペクトル解析を試みた。

バナナの葉、仮茎、皮など果実を除く地上部位抽出物に抗アンドロゲン作用があることが確認された。その中でも、バナナの皮抽出物の活性成分を単離して解析を行った結果、バナナ皮に含まれる抗アンドロゲン活性成分の1つとして Cycloeucalenone が単離できた。

レモンの葉にアンドロゲン作用を見出した。レモン葉は品種間に活性の差異はなく、熱水抽出物においてもアンドロゲン作用が確認された。分画を行った結果 2 つ以上の活性成分が存在することが明らかになった。

先述したように、LOH 症候群の場合、症状に合わせて改善のために機能性食品素材を選択すべきであるのにも関わらず、まだ選択肢が少ないのが現状である。本研究では、抗アンドロゲン作用をもつ素材としてバナナ皮、アンドロゲン作用をもつ素材としてレモン葉を示した。これらは食経験もあるので、今後、更年期男性の QOL 改善に役立つ可能性が高いと期待できる。

## 目次

第1章	序論	1
1 - 1	男性更年期障害	1
1 - 2	男性更年期とテストステロン	1
1 - 3	テストステロンとジヒドロテストステロン	3
1 - 4	現在使用されている薬物療法	4
1 - 5	機能性食品素材について	5
1 - 6	本研究の目的	6
第2章	実験方法	7
2 - 1	研究方針	7
2 - 2	試薬、その他	7
2 - 3	実験動物の飼育と管理	7
2 - 4	男性更年期モデルマウスを用いた試験 ( <i>in vivo</i> )	8
2 - 4 - 1	Finasteride 投与による前立腺大きさおよび精嚢腺重量への影響	10
2 - 4 - 2	去勢マウスと非去勢マウスも感受性の比較	12
2 - 5	LNCaP 細胞を用いた細胞増殖試験 ( <i>in vitro</i> )	15
2 - 6	有効成分の単離・精製	16
2 - 6 - 1	単離・精製の基本操作	16
2 - 6 - 2	クロマトグラフィー	16
2 - 7	機器分析	17
2 - 7 - 1	<sup>1</sup> H 核磁気共鳴スペクトル ( <sup>1</sup> H NMR)	17
2 - 7 - 2	<sup>13</sup> C 核磁気共鳴スペクトル ( <sup>13</sup> C NMR)	17
2 - 7 - 3	二次元核磁気共鳴スペクトル	17
2 - 7 - 4	高分解能質量分析	18
第3章	バナナ ( <i>Musa spp.</i> ) の抗アンドロゲン作用に関する研究	19
3 - 1	天然物サンプルスクリーニング結果	19

3 - 2	バナナ ( <i>Musa spp.</i> ) とは	22
3 - 3	バナナの皮抽出物投与のマウスに及ぼす影響	23
3 - 4	バナナ皮の抗アンドロゲン活性成分の単離および同定	25
3 - 4 - 1	バナナ皮の分画	25
3 - 4 - 2	活性成分の構造決定	32
3 - 4 - 3	精製した活性成分を用いた活性試験	33
3 - 5	バナナ皮抽出物の DHT 投与マウスへの影響	35
3 - 6	ノギリヤシ抽出物との比較試験	37
3 - 7	バナナ皮抽出法について	39
3 - 8	Cycloeucaleone と植物ステロールの比較試験	41
3 - 9	バナナ各抽出物の活性試験	43
3 - 10	考察	46

#### 第4章 レモン (*Citrus limon*) 葉のアンドロゲン作用に関する研究

4 - 1	レモン ( <i>Citrus limon</i> ) とは	47
4 - 2	レモン葉抽出物投与のマウスに及ぼす影響	48
4 - 2 - 1	アルコール抽出物投与のマウスに及ぼす影響	48
4 - 2 - 2	熱水抽出物投与のマウスに及ぼす影響	50
4 - 2 - 3	品種間における活性比較試	52
4 - 3	レモン葉抽出物投与の LNCaP 細胞増殖に及ぼす影響	54
4 - 4	レモン葉のアンドロゲン活性成分の単離および同定	55
4 - 4 - 1	ヘキサン画分	59
4 - 4 - 2	ブタノール画分	63
4 - 5	考察	68

#### 第5章 総括

参考文献	71
謝辞	73

添付資料1 (Cycloeucalenone NMRスペクトルデータ)

添付資料2 (男性脱毛症に有効な新規食品素材探索の *in vivo* 試験系確立)